

DOI: 10.13376/j.cblls/2016156

文章编号: 1004-0374(2016)10-1180-09



张大兵, 上海交通大学讲席教授(2015至今)和特聘教授(2008—2015年), 教育部长江学者奖励计划特聘教授(2009年)、国家杰出青年基金获得者(2007年)、国家百千万人才工程入选者(2009年)、上海市优秀学科带头人(2007年), 获澳大利亚阿德莱德大学荣誉博士学位(2014年), 并担任阿德莱德大学兼职教授(2015年至今)和诺丁汉大学客座教授(2015年至今)。张大兵及其研究团队在水稻遗传学方面开展了系统研究工作, 揭示了控制花粉发育的细胞程序性死亡、脂类代谢等新机制; 在 *Science*、*PNAS*、*Plant Cell*、*Nat Commun* 等期刊发表论文 130 多篇; 张大兵教授被美国植物生物学家学会评为 2009—2013 年度亚洲高引作者; 以第一完成人身份获得上海市科技进步奖一等奖(2004年、2012年)、上海市自然科学牡丹奖(2012年)。

水稻雄性发育功能基因的发掘及应用

王多祥, 祝万万, 袁 政, 张大兵*

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘 要: 水稻雄配子体发育包含花药细胞分化、绒毡层细胞程序性死亡、花粉壁形态建成和受精等连续的发育过程, 是生殖发育基础理论研究和水稻育种特别是杂交育种的关键过程。现重点介绍近年来国内外水稻雄性发育分子调控机制的最新研究进展, 并概述雄性不育系在杂种优势利用、杂交不亲和等重要农艺性状控制方面的理论基础。

关键词: 水稻; 雄蕊; 雄性不育; 绒毡层细胞; 花粉壁; 受精

中图分类号: Q943; Q945.6; S511 **文献标志码:** A

Functional research of rice male reproduction and its utilization in breeding

WANG Duo-Xiang, ZHU Wan-Wan, YUAN Zheng, ZHANG Da-Bing*

(School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Development of rice male gametophyte is a critical course in seed formation, propagation. Male reproduction is a consecutive process which includes anther cell differentiation, tapetum program cell death, pollen wall formation and fertilization, etc. In this review, we mainly focused on the recent research progress on the key molecular regulators on rice male development. We also summarized the molecular basis underlying the male sterile lines used in hybrid seed production as well as the sterility of hybrid.

Key words: rice; stamen; male sterility; petal cell; pollen wall; fertilization

水稻雄性不育系的发现与杂种优势的广泛应用作用, 为我国乃至全世界粮食安全发挥了重要的作用 [1-2]。从基因型组成角度上划分, 水稻雄性不育在杂交水稻的研究和生产推广中发挥了举足轻重的

收稿日期: 2016-08-02

基金项目: 国家重点研发计划“水稻功能基因组研究与应用”(2016YFD0100900); 国家重点研发计划“主要农作物杂种优势形成与利用机理”(2016YFD0100804)

*通信作者: E-mail: zhangdb@sjtu.edu.cn

包括细胞核不育 (genic male sterility, GMS) 和核质互作不育 (亦即细胞质雄性不育; cytoplasmic male sterility, CMS)。目前生产中利用的主要是光温敏核不育系和核质互作型雄性不育系。近年来, 国内外科学家在水稻雄配子体发育的分子机制研究方面取得了长足的进展, 本文就水稻雄性发育分子机制及杂交育种中雄性不育系分子机理研究进展进行综述。

1 水稻核不育基因及其作用机制

典型的水稻花药包括孢子体和配子体两部分, 孢子体包括花药壁 (从外到内依次是表皮层、内皮层、中间层和绒毡层)、连接四个花药腔的连接组织和维管束, 配子体为花粉母细胞经过减数分裂形成的小孢子。水稻花的发育过程与双子叶植物拟南芥大不相同, 但二者雄性生殖器官发育具有相似的调控机制^[3]。水稻花药整个发育过程可以分为 14 个时期, 从雄蕊原基的形成开始, 需要经过分生组织特化、细胞的分裂与分化等生物学过程^[4-5]。

1.1 花药细胞早期分化

定位在细胞膜上的富含亮氨酸的受体样蛋白激酶 (leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, LRR-RLKs) 在花药壁细胞和小孢子母细胞分化过程中起重要作用^[6]。水稻 *MSP1* (*MULTIPLE SPOROCTE 1*) 是拟南芥 *EMS1/EXS* (*EXCESS MICROSPOROCTE1/EXTRA SPOROGENOUS CELLS*) 的同源基因, 编码一个富含亮氨酸重复的受体样蛋白激酶, 主要负责调控小孢子形成的起始并且促进花药壁的形成^[7-8]。水稻 *OsTDL1/MIL2* (*TAPETAL DETERMINANT 1 (TPD1)-like 1A/MICROSPORELESS 2*) 和拟南芥 *TPD1* (*TAPETAL DETERMINANT 1*) 基因同源, 能与 *MSP1* 蛋白形成复合体, 参与造孢细胞的产生、绒毡层细胞特征建立以及花药壁的正常发育^[9-10]。

TIP2 (*TDR INTERACTING PROTEIN2*) 是一个 bHLH 类型的转录因子, 在花药壁中特异表达, 参与花药壁的分化和小孢子母细胞的减数分裂过程。*tip2* 突变体花药壁内皮层、中间层和绒毡层细胞在第 7 期开始停止分化, 同时小孢子母细胞减数分裂从后期 I 开始出现异常, 导致雄性不育^[11]。值得注意的是, 野生型水稻花药壁细胞只通过径向分裂的方式复制, 而 *tip2* 突变体花药壁细胞出现切向分裂的现象, 推测花药壁内层细胞的分化与分裂可能存在某些联系。

1.2 绒毡层细胞程序性死亡

绒毡层是花药壁的最内层, 与小孢子母细胞及

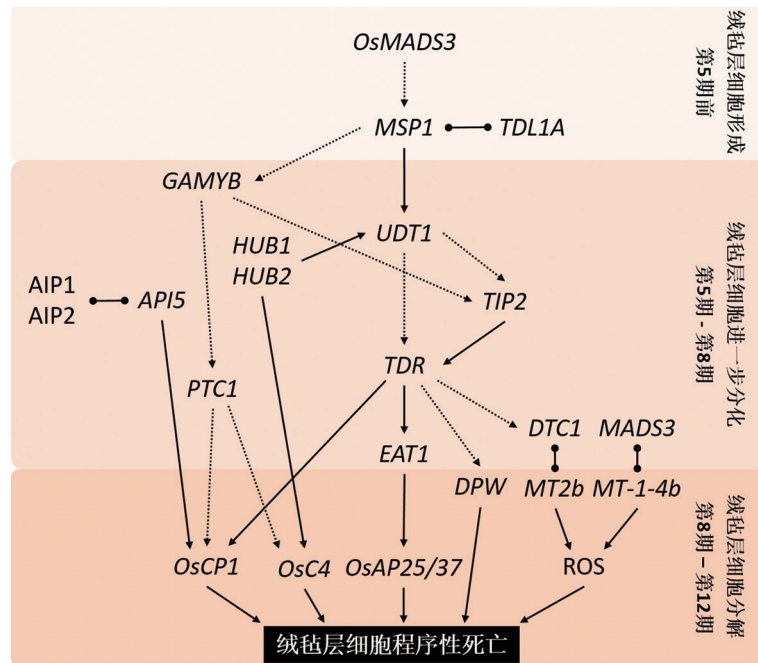
小孢子直接接触, 在小孢子母细胞减数分裂期间代谢旺盛。当小孢子从四分体中释放出来后, 绒毡层开始降解, 到第 11 期即小孢子第一次有丝分裂时期, 绒毡层已完全降解, 仅剩残留物。绒毡层为小孢子母细胞减数分裂和小孢子的发育提供营养并参与小孢子的释放过程, 分泌脂类参与花粉外壁和花药外壁的合成, 绒毡层的发育过程受到一系列基因的调控 (图 1), 绒毡层细胞的发育异常将最终使小孢子败育, 导致雄性不育。水稻 *GAMYB*^[12-13]、*UDT1* (*UNDEVELOPED TAPETUM 1*)^[14]、*TDR* (*TAPETUM DEGENERATION RETARDATION*)^[15]、*PTC1* (*PERSISTENT TAPETAL CELL 1*)^[16] 和 *API5* (*APOPTOSIS INHIBITOR 5*)^[17] 等都能够直接参与绒毡层细胞程序性死亡过程。

EAT1 (*ETERNAL TAPETUM 1*) 是一个 bHLH 类型的转录因子, 能够调节天冬氨酸蛋白酶基因 *OsAP25* 和 *OsAP37* 的转录, 启动绒毡层细胞程序性死亡^[18]。*TIP2* 能够与 *TDR* 形成异源二聚体结合到 *EAT1* 的启动子上, 直接促进其表达^[11]。我们推测, *TIP2*、*TDR* 和 *EAT1* 可能是进化中通过基因复制并自然选择形成的调控机制, 三者是绒毡层细胞程序性死亡的核心调控因子, 通过级联调控的方式决定细胞的发育进程。

组蛋白 H2B 单泛素化修饰能够调控许多基因的转录活性, 对于真核生物的个体发育具有重要的作用。通过对 E3 泛素连接酶 HUB1 (histone mono-ubiquitination 1) 和 HUB2 的研究发现, 二者能够提高 *OsC4*、*OsCPI* 和 *UDT1* 基因区段上组蛋白 H2B 的单泛素化修饰和组蛋白 H3 的甲基化水平, 继而影响绒毡层降解和小孢子发育^[19]。细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的代谢平衡是细胞存活的前提, 高浓度的 ROS 可以直接破坏细胞膜结构, 造成细胞死亡。最近研究发现, 水稻 *MADS3* 和 *DTC1* (*DEFECTIVE TAPETUM CELL 1*) 能够分别调控金属硫蛋白 *OsMT-1-4b* 和 *OsMT2b* 的蛋白活性, 维持绒毡层细胞中 ROS 平衡^[20-21]。绒毡层细胞的程序性死亡还能被生殖细胞所调节。*MTR1* (*MICROSPORE AND TAPETUM REGULATOR 1*) 编码一种分泌性糖蛋白, 在水稻雄性生殖细胞中特异表达, 被小孢子分泌到细胞外与绒毡层细胞表面受体相互作用, 调控绒毡层细胞的程序性死亡^[22]。

1.3 花粉壁形态建成

花粉壁对花粉的发育、体外存活、受精等重要生物学过程发挥重要作用。花粉外壁的形成需要孢



—>表示转录因子直接调控下游基因，····>表示对下游基因的间接调控，●—●表示蛋白质之间的相互作用。

图1 绒毡层细胞分化及程序性死亡相关基因及其调控网络

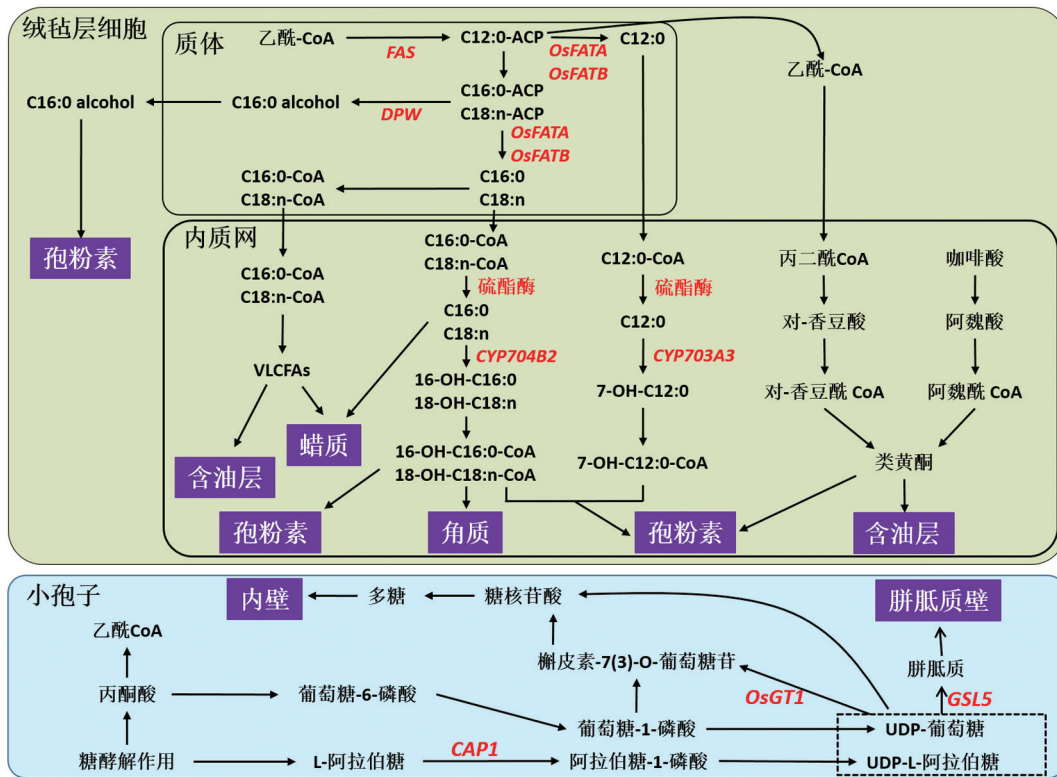
子体绒毡层细胞和配子体小孢子基因互相作用，特别是绒毡层细胞是合成花粉壁前体物质的主要场所，这些物质在绒毡层细胞中合成后可分泌到细胞外，并逐渐沉积形成具有特殊结构的壁组织（图2）。花粉壁的形成起始于第8期即减数分裂时期，小孢子被胼胝质包裹形成四分体；随后，围绕小孢子的胼胝质被绒毡层分泌的葡聚糖酶水解。当绒毡层细胞开始降解时，小孢子外逐渐形成由纤维素骨架和孢粉素构成的初生壁。到小孢子发育中期，光学显微镜下可见小孢子外壁结构。成熟的花粉壁具有三层结构：外壁、内壁和花粉外壁。花粉外壁由外向内又可以分为三层结构：网状层、外壁外层和外壁内层。和拟南芥等植物不同，水稻、小麦等作物绒毡层具有特征性的乌氏体，能够将绒毡层细胞合成的孢粉素前体物质运输到药室中，参与花粉外壁的形成。近年来已经有多篇文章对植物花粉壁的形态建成进行了系统的综述^[23-26]。

糖类物质代谢对于花粉壁维持正常发育是必不可少的。水稻胼胝质合成酶 *GSL5* 在减数分裂过程中促进小孢子外胼胝质的积累^[27]。UDP-阿拉伯糖变位酶 *UAM3* (UDP-arabinopyranose mutases 3) 催化孢粉素的生物合成^[28]。另外，UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因 *Ugp1* (UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1)^[29]、 β -1,3-葡聚糖酶基因 *Osg1* (β -1,3-GLUCANASES

I)^[30]、*CAP1* (COLLAPSED ABNORMAL POLLEN 1)^[31]、*OsGT1* (GLYCOSYLTRANSFERASE 1)^[32] 等基因都直接参与减数分裂后小孢子外壁胼胝质的降解过程。

为了保障花粉正常发育，绒毡层细胞具有特化的质体结构，推测在绒毡层细胞质体中可从头合成脂肪酸，并能够被酯化形成长链酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACPs)，后者可以被分解之后运输到内质网中，或者直接被定位在质体内的脂肪酸还原酶 *DPW* (defective pollen wall) 还原形成脂肪醇^[33]。进入细胞质的脂肪醇可以用来合成脂肪酸，从而直接作为孢粉素的前体物质运输到药室中。定位在内质网中的细胞色素 P450 成员 *CYP704B2*^[34] 和 *CYP703A3*^[35] 可以将脂肪酸羟基化。*DPW2* 编码一个 BAHD 家族的酰基转移酶，在体内催化羟基肉桂酰的转移反应，*dpw2* 突变体花药角质层中芳香族脂肪酸和 ω -脂肪酸含量增加，而花粉粒中酚类物质含量显著性降低^[36]。*WDA1* (wax-deficient anther 1) 蛋白的 N-端含有一个甾醇脱氢酶结构域，该结构域一般与植物表皮层蜡质合成相关。有趣的是，*WDA1* 在花药表皮层中特异表达，但是 *wda1* 突变体花粉外壁出现明显的结构缺陷，说明花药表皮层与花粉壁形成过程之间存在某种联系^[37]。

花粉壁合成所需的前体物质主要在绒毡层细胞中合成，在植物中 ABC 家族蛋白 (ATP-binding



红色表示水稻花粉壁发育相关基因或酶。绒毡层细胞合成的孢粉素前体、角质、蜡质等是花粉外壁和含油层的重要组分。小孢子主要负责花粉内壁和胼胼质壁的合成。

图2 水稻花粉壁生物合成途径

cassette)、转脂蛋白 (lipid transfer protein) 和 MATE 蛋白 (multidrug and toxic efflux proteins) 负责将绒毡层合成的孢粉素前体物质运输到药室中。水稻 *OsABCG15/PDA1* (*ATP BINDING CASSETTE G 15/POST-MEIOTIC DEFICIENT ANther 1*) 基因的突变体花药绒毡层细胞不能正常降解, 导致花粉外壁和角质的形成受到影响, 说明该基因在转运脂类物质前体的过程中起作用^[38-39]。*OsABCG26* 也是一个属于 ABCG 家族的跨膜蛋白, 研究表明 *OsABCG26* 能够形成同源或者异源二聚体将绒毡层细胞合成的角质运输到花药外壁, 促进花药外壁角质层的形成^[40], 说明 ABCG 家族蛋白在花药角质转运过程中具有重要的功能。另外, *OsC6* 属于转脂蛋白家族, 在第 9 至 11 期的绒毡层细胞和小孢子中表达, 能够被 TDR 直接调控, 负责脂质运输, 参与花粉外壁的形成^[41]。

花粉壁的形成是孢子体和配子体共同参与的, 所以水稻中一部分参与绒毡层细胞 PCD 过程的调控因子 *GAMYB*^[13]、*PTCI*^[16]、*TDR*^[42]、*EAT1*^[18]、*TIP2*^[11] 对于花粉壁的发育是必不可少的。花粉壁的生物合

成是一个复杂的过程, 过去的研究使人们对该过程的理解不断深入。但是, 仍然存在许多问题亟待进一步研究, 例如植物激素通过何种途径参与花粉壁生物合成, 小孢子和绒毡层细胞是怎样协同调控花粉壁发育的, 表皮层、内皮层和中间层是否能够影响花粉壁的正常形成。所以说, 进一步研究调节花粉壁合成的基因及其调控网络, 同时比较不同物种之间存在的异同是十分必要的。

1.4 环境敏感型细胞核不育基因及其研究进展

环境敏感型不育系 (environmental genic male sterility, EGMS) 是由细胞核基因突变引起的, 在一定的温度和光照条件下可以恢复育性。在农业生产中, EGMS 既可以作为不育系进行杂交制种, 又可以作为保持系自交繁种, 使杂交水稻的育种从三系法发展为两系法, 大大简化了制种流程, 降低了生产成本。EGMS 是由核基因控制的, 因而不用考虑杂交父本有无恢复基因的问题, 增加了水稻配种范围, 有利于杂种优势的利用。目前, 水稻环境敏感型核不育系已被报道, 人们对多个诱导 EGMS 产生的基因的作用机制有了初步的认识。

NK58S 是一个自然光敏核不育 (photoperiod-sensitive genic male sterility, PGMS) 突变体, 在长日照高温条件下表现出完全不育。研究发现, NK58S 的一个长非编码 RNA LDMAR (long-day-specific male-fertility-associated RNA) 的序列出现一处 SNP 位点, 使其自身启动子区的甲基化水平升高, 在长日照条件下转录量降低, 导致雄性不育。通过杂交手段将这个位点引入水稻培矮 64 后, 育成温敏核不育系 PA64S^[43]。LDMAR 能被加工成 21 nt 的 miRNA osa-smR5864, 该 miRNA 主要在花序中积累且不受光照周期和温度的影响^[44]。目前 ncRNA 的靶基因尚未被鉴定, 但是说明环境因素可以与表观修饰相互作用, 从而调节植物育性。*CSA* (*CARBON STARVED ANther*) 编码一个 R2R3 型的 MYB 转录因子, 能够直接调节花药中单糖转运蛋白基因 *MST8* (*MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 8*) 的转录^[45]。*csa* 突变体属于短日光敏核不育系, 在长日照条件下可育, 而在短日照条件下花药中糖分含量显著降低, 导致雄性不育。将粳稻 JP69 作为恢复系与 *csa* 突变体杂交, F1 代表现出明显的杂种优势, 表明 *csa* 突变体在农业生产中具有实际意义^[46]。2015 年, Zhu 等^[47] 研究发现, 油菜素内酯信号因子 OsBZR1 可以直接结合到 *CSA* 的启动子上从而促进其表达, 使花药和种子中的糖分含量显著提高。

除独立发现的温敏不育系 (thermo-sensitive genic male sterility, TGMS) 之外, 大多数 TGMS 是由农垦 58S 衍生而来的。2011 年, 我国种植的两系杂交稻中, 有 71 个品种是用带有 *tms5* 的两用不育系培育而成, 占有两系杂交稻品种的 71%, 其种植面积超过全国两系杂交稻种植面积的 80%。其中广占 63S 属于光温敏型核不育系, 是目前两系杂交稻中广泛应用的粳型光温敏核不育系之一^[48]。众多遗传分析表明, 温敏不育为单隐性基因控制, 目前已经对 13 个 TGMS 和一个 rTGMS 基因进行了定位。2007 年, Yang 等^[49] 将控制安农 S-1 的不育基因 *tms5* 定位在第 2 号染色体上 19 kb 的区域; 2013 年, Sheng 等^[50] 则将控制株 IS 的温敏不育基因 *tms9* 定位于第 1 号染色体上的不同区间, 认为是不同于安农 S-1 的一个新基因; 2012 年, 赵敏会^[51] 将控制绵 9S 的不育基因定位在第 2 号染色体上, 并认为一个编码细胞分裂素脱氧酶前体的基因 *LOC_Os02g12780* 为其候选基因; 2014 年, Qi 等^[52] 将衡农 S-1 的不育基因定位于第 9 号染色体, 并认为水稻中的雄性不育同源基因 *OsMS1* 为其候选基因, 在不育系衡农 S-1

中存在一个 T 转换为 C 的 SNP 造成氨基酸的替换, 引起温敏不育。2010 年, 王宝和等^[53] 将广占 63S 的不育基因 *ptgms2-1* 定位在第 2 号染色体 390 kb 的区域。2011 年, Xu 等^[54] 将 *ptgms2-1* 基因定位在第 2 号染色体 50.4 kb 的区域, 与 InDel 标记 S2-43 共分离, 并提出候选基因为一个核糖核酸酶 *ZiRNaseZ* 基因, 认为广占 63S 在该基因第一个外显子中存在无义突变, 造成翻译提前终止, 产生缩短的蛋白从而引起不育。

2014 年, Zhou 等^[55] 的研究克隆了控制株 IS 和安农 S-1 温敏不育的基因 *tms5*, 并发现 *tms5* 基因是控制我国温敏不育系的主要基因。*TMS5* 编码一个短的核糖核酸酶 RNase Z^{S1}, 在花药发育过程中该酶能够水解泛素 60S-核糖核蛋白 Ub_{L40} 的 mRNA。*TMS5* 突变后, 在高温条件下, Ub_{L40} 的 mRNA 在花药中大量积累, 导致雄性不育。Wuxiang S (WXS) 是在 WXF 的基础上诱变得到的水稻光温敏核不育系。2015 年, Zhang 等^[56] 对其进行 miRNA 分析发现, 与 WXF 相比 WXS 中有 26 个 miRNA 的转录水平出现明显变化, 其中 osa-miR156a-j、osa-miR164d 和 osa-miR528 的靶基因是花药发育所必需的。该研究进一步证明, 温度、光照时间等环境因素可能通过表观遗传方式参与植物的正常发育。

2 细胞质雄性不育及其恢复基因

细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是由线粒体基因组变异导致的植株营养生长和雌配子体发育正常, 而不能产生正常雄配子的现象。用含有显性恢复基因 *Rf* (restorers of fertility) 的恢复系与 CMS 不育系杂交, 产生的 F1 代育性恢复并且具有明显的杂种优势现象。目前, CMS 株系广泛应用于多种作物的杂交育种, 在生产上应用的 CMS 主要包括野败型 (CMS-WA)、包台型 (CMS-BT) 和红莲型 (CMS-HL)。

与核基因组相比, 线粒体基因组更容易发生非同源重组和位点特异性重组, 产生新的开放阅读框 (open reading frame, orf), 转录形成新的嵌合蛋白, 从而影响线粒体的功能造成雄性不育。研究发现, 新 orf 主要来源于线粒体电子传递链和 ATP 酶复合体的组分, 例如 *cox1*、*atp6* 和 *atp8*^[57]。虽然已经发现了多种 CMS 株系的 orf 和相应的恢复基因, 但是对于 CMS 株系产生及其育性恢复的分子机制还知之甚少。

2013 年, Luo 等^[58] 发现, 在水稻 CMS-WA 株

系中, WA352 在绒毡层细胞中能够与核基因编码的 OsCOX11 (cytochrome oxidase 11) 相互作用, 抑制 COX11 对 ROS 的清除作用, 致使线粒体中细胞色素 C 释放, 过早启动绒毡层细胞程序性死亡, 导致雄性不育^[59]。CMS-BT 与 CMS-LD 都是由于线粒体基因组上 *orf79* 重排导致的, RF1 能够同时作用于 CMS-BT 和 CMS-LD, 恢复二者的育性^[60]。2016 年, Kazama 等^[61] 研究发现, RF2 也是一个 CMS-LD 的恢复基因, 但是 RF2 并不能完全恢复 CMS-BT 的育性, 说明 RF1 和 RF2 具有不同的作用机制, 这种差异是如何生成的还需要进一步的研究。

CMS-HL 是一种重要的胞质不育系, 目前在中国和东南亚地区的种植面积约有四百万公顷^[62]。在 CMS-HL 的花药中, ORFH79 能够与线粒体电子传递链复合体 III 的 P61 亚基结合, 导致复合体 III 的活性降低, 使线粒体产生的能量不足以满足花粉发育的需求^[63]。两个非等位的恢复基因 *Rf5* 和 *Rf6* 通过不同的机制影响 CMS-HL 的育性^[64]。有趣的是, RF6 也能使 CMS-BT 的育性恢复。RF6 通过何种机制参与线粒体 RNA 的转录后修饰, 以及 RF6 在 CMS-BT 和 CMS-HL 中是否通过相同的途径起作用等问题仍然有待于进一步研究。育性恢复复合体 (restoration of fertility complex, RFC) 能够在 CMS-HL 恢复系中结合并降解 *orfH79* 的 mRNA, 使育性得以回复。RFC 可能是由许多亚基构成的蛋白质复合体, 目前已经鉴定出其中三个亚基, RF5、GRP162 和 RFC3^[65]。

3 杂种不育

杂种不育 (hybrid sterility) 是指亲缘关系相近的种或亚种之间不能正常杂交, 或者杂交后代生殖能力下降的现象, 具体表现有雌配子败育、雄配子败育、雌雄异熟、胚乳发育异常等。亚洲栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 的亚种粳稻 (*japonica*) 和籼稻 (*indica*) 之间的生殖隔离就是典型的杂种不育现象, 探究粳籼稻之间杂种不育的遗传机理, 对于了解生殖隔离、克服杂种不育、培育优良品种具有重要的理论及实践意义。研究人员已经成功定位到了几十个基因座与杂种不育紧密连锁。目前, 普遍认为水稻杂种不育是由基因控制的, Oka^[66] 提出的“重复配子致死模型”和北村英一^[67] 提出的“孢子体-配子体互作模型”被广泛地用来阐释水稻杂种 F1 代不育现象。另外, 一些水稻品种可以与粳籼稻分别杂交产生可育后代, 被称为广亲和型品种 (wide-compatibility

varieties, WCVs), 具有广亲和基因 *S-n*。目前, 已经有多篇对水稻杂种不育的研究进行了系统的报道^[68-69], 近年来对该领域的不断研究进一步深化了人们对水稻杂种不育的理解。

杂种不育往往是由多种原因造成的, 一个 *S-n* 基因很难使杂种 F1 代的育性完全恢复。*S5* 和 *f5* 分别是控制水稻雌配子和雄配子杂交不育的关键位点。2016 年, Mi 等^[70] 将广亲和基因 *S5-n* 和 *f5-n* 渗入 9311, 育成含有 *S5-n* 的近等基因系 NIL-(*S5-n*)、含有 *f5-n* 的 NIL-(*f5-n*) 以及同时含有 *S5-n* 和 *f5-n* 的 PL-(*S5-n* + *f5-n*) 三个株系。研究发现, 广亲和型基因对水稻杂种不育的影响具有积累效应, 同时将多个广亲和基因渗入杂交亲本可以极大地提高粳籼杂种 F1 代的育性。传统的观点认为, *f5* 与另一个杂种不育基因座 *S35* 同时受到一个显性抑制因子 *EFS* (EPISTATIC FACTOR FOR *S24*) 的控制, 三者在遗传学上是相互联系的。2016 年, Kubo 等^[71] 通过进一步研究 *f5* 和 *S35* 位点并将二者分离发现, *S35* 与 *f5* 都可以导致水稻杂种不育, 但是 *S35* 对杂交 F1 代花粉的影响并不依赖于 *f5*。而邻近 *f5* 位点的基因 *INK* (INCENTIVE FOR KILLING POLLEN) 能够激活 *S35* 导致杂种不育, 说明 *INK-S35* 和 *EFS-f5* 是两种相互独立的机制分别导致水稻杂种不育。研究人员通过利用粳稻与南美野生稻 *O. glumaepatula* 杂交发现, 2 号染色体短臂上 *S22A* 和 *S22B* 位点与杂种 F1 代花药发育相关, 含有 *S22A-glum* 或 *S22B-glum* 的花粉都不能正常发育^[72]。*S7* 是一个控制 Aus 和爪哇种水稻杂种不育的关键位点^[73]。研究发现, *S7* 定位在 7 号染色体的着丝粒区域, 包含 16 个可能的 ORF。其中, 抑制 *ORF3* 的表达, 可以使杂种 F1 代的育性恢复, 然而具体的作用机制还不清楚^[74]。*hsa1* (hybrid sterility-a 1)、*hsa2*、*has3* 也是控制粳籼稻杂种不育的关键位点。2016 年, Kubo 等^[75] 研究发现, *hsa1* 位点含有两个基因, *HSA1a* 和 *HSA1b*, 二者通过相互作用共同影响雌配子体发育。将籼稻中的 *HSA1a-i-HSA1b-i* 同时渗入粳稻, 导致粳稻近等基因系植株中大孢子败育, 并且 *hsa1* 造成的杂种不育效应能够传递到 F2 代中。

4 展望

水稻雄性发育是一个复杂而精确的生物学过程, 近年来随着分子生物学技术的飞速发展和功能基因组学研究的不断深入, 使人们对植物生殖发育的分子机制有了更加全面的认识。在不远的将来,

利用转基因和靶基因定向编辑技术可以筛选出优良的雄性不育系, 从而培育出产量更高、品质更好、更适于栽培的杂交水稻新品种, 以解决目前粮食短缺的问题。

[参 考 文 献]

- [1] 邓兴旺, 王海洋, 唐晓艳, 等. 杂交水稻育种将迎来新时代. 中国科学, 2013, 43: 864-8
- [2] Zhang D, Liang W. Improving food security: Using male fertility for hybrid seed breeding. Science, 2016, sponsored collection: 45
- [3] Wilson Z, Zhang D. From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. J Exp Bot, 2009, 60: 1479-92
- [4] Zhang D, Luo X, Zhu L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development. J Genet Genomics, 2011, 38: 379-90
- [5] Zhang D, Wilson Z. Stamen specification and anther development in rice. Chin Sci Bull, 2009, 54: 2342-53
- [6] Zhang D, Yang L. Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther. Curr Opin Plant Biol, 2014, 17: 49-55
- [7] Nonomura KI, Miyoshi K, Eiguchi M, et al. The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. Plant Cell, 2003, 15: 1728-39
- [8] 王莹, 王幼芳, 张大兵. 水稻*mSP1-4*突变体的鉴定及其*UDT1*和*GAMYB*基因的表达分析. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32: 527-34
- [9] Hong L, Tang D, Shen Y, et al. MIL2 (MICROSPORELESS 2) regulates early cell differentiation in the rice anther. New Phytol, 2012, 196: 402-13
- [10] Yang L, Qian X, Chen M, et al. Regulatory role of OsTDL1A-MSP1 signaling in specifying anther cell identity in rice. Plant Physiol, 2016: pp. 00016.2016
- [11] Fu Z, Yu J, Cheng X, et al. The rice basic helix-loop-helix transcription factor TDR INTERACTING PROTEIN 2 is a central switch in early anther development. Plant Cell, 2014, 26: 1512-24
- [12] Kaneko M, Inukai Y, Ueguchi-Tanaka M, et al. Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair α -amylase expression in aleurone and flower development. Plant Cell, 2004, 16: 33-44
- [13] Liu Z, Bao W, Liang W, et al. Identification of *gamyb-4* and analysis of the regulatory role of *GAMYB* in rice anther development. J Integr Plant Biol, 2010, 52: 670-78
- [14] Jung KH, Han MJ, Lee YS, et al. Rice *Undeveloped Tapetum1* is a major regulator of early tapetum development. Plant Cell, 2005, 17: 2705-22
- [15] Li N, Zhang D, Liu H, et al. The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. Plant Cell, 2006, 18: 2999-3014
- [16] Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, et al. *PERSISTENT TAPETAL CELL1* encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice. Plant Physiol, 2011, 156: 615-30
- [17] Li X, Gao X, Wei Y, et al. Rice APOPTOSIS INHIBITOR 5 coupled with two DEAD-box adenosine 5'-triphosphate-dependent RNA helicases regulates tapetum degeneration. Plant Cell, 2011, 23: 1416-34
- [18] Niu N, Liang W, Yang X, et al. EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. Nat Commun, 2013, 4: 1445
- [19] Cao H, Li X, Wang Z, et al. Histone H2B monoubiquitination mediated by HISTONE MONOUBIQUITINATION 1 and HISTONE MONOUBIQUITINATION 2 is involved in anther development by regulating tapetum degradation-related genes in rice. Plant Physiol, 2015, 168: 1389-405
- [20] Hu L, Liang W, Yin C, et al. Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development. Plant Cell, 2011, 23: 515-33
- [21] Yi J, Moon S, Lee Y S, et al. Defective Tapetum Cell Death 1 (DTC1) regulates ROS levels by binding to metallothionein during tapetum degeneration. Plant Physiol, 2016, 170: 1611-23
- [22] Tan H, Liang W, Hu J, et al. *MTR1* encodes a secretory fasciclin glycoprotein required for male reproductive development in rice. Dev Cell, 2012, 22: 1127-37
- [23] Shi J, Cui M, Yang L, et al. Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. Trends Plant Sci, 2015, 20: 741-753
- [24] Zhang D, Li H. Exine export in pollen[M]//Plant ABC transporters. Switzerland: Springer International Publishing, 2014: 49-62
- [25] Zhang DB, Yang XJ, Shi JX. Role of lipids in plant pollen development[M]//Lipids in plant and algae development. Switzerland: Springer International Publishing, 2016: 315-37
- [26] Li H, Zhang D. Biosynthesis of anther cuticle and pollen exine in rice. Plant Signal Behav, 2010, 5: 1121-3
- [27] Shi X, Sun X, Zhang Z, et al. GLUCAN SYNTHASE-LIKE 5 (GSL5) plays an essential role in male fertility by regulating callose metabolism during microsporogenesis in rice. Plant Cell Physiol, 2015, 56: 497-509
- [28] Sumiyoshi M, Inamura T, Nakamura A, et al. UDP-arabinopyranose mutase 3 is required for pollen wall morphogenesis in rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Physiol, 2015, 56: 232-41
- [29] Chen R, Zhao X, Shao Z, et al. Rice UDP-glucose pyrophosphorylase 1 is essential for pollen callose deposition and its cosuppression results in a new type of thermosensitive genic male sterility. Plant Cell, 2007, 19: 847-61
- [30] Wan L, Zha W, Cheng X, et al. A rice β -1,3-glucanase gene *Osg1* is required for callose degradation in pollen development. Planta, 2011, 233: 309-23
- [31] Ueda K, Yoshimura F, Miyao A, et al. *COLLAPSED ABNORMAL POLLEN1* gene encoding the arabinokinase-like protein is involved in pollen development in rice. Plant Physiol, 2013, 162: 858-71
- [32] Moon S, Kim SR, Zhao G, et al. Rice *GLYCOSYL-*

- TRANSFERASE1* encodes a glycosyltransferase essential for pollen wall formation. *Plant Physiol*, 2013, 161: 663-75
- [33] Shi J, Tan H, Yu XH, et al. Defective pollen wall is required for anther and microspore development in rice and encodes a fatty acyl carrier protein reductase. *Plant Cell*, 2011, 23: 2225-46
- [34] Li H, Pinot F, Sauveplane V, et al. Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the ω -hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice. *Plant Cell*, 2010, 22: 173-90
- [35] Yang X, Wu D, Shi J, et al. Rice CYP703A3, a cytochrome P450 hydroxylase, is essential for development of anther cuticle and pollen exine. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56: 979-994
- [36] Xu D, Shi J, Rautengarten C, et al. *Defective Pollen Wall 2 (DPW2)* encodes an acyl transferase required for rice pollen development. *Plant Physiol*, 2016 [Epub ahead of print]
- [37] Jung KH, Han MJ, Lee DY, et al. Wax-deficient anther 1 is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development. *Plant Cell*, 2006, 18: 3015-32
- [38] Hu L, Tan H, Liang W, et al. The *Post-meiotic Deficient Anther1 (PDA1)* gene is required for post-meiotic anther development in rice. *J Genet Genomics*, 2010, 37: 37-46
- [39] Zhu L, Shi J, Zhao G, et al. *Post-meiotic deficient anther1 (PDA1)* encodes an ABC transporter required for the development of anther cuticle and pollen exine in rice. *J Plant Biol*, 2013, 56: 59-68
- [40] Zhao G, Shi J, Liang W, et al. Two ATP binding cassette G transporters, rice ATP binding cassette G26 and ATP binding cassette G15, collaboratively regulate rice male reproduction. *Plant Physiol*, 2015, 169: 2064-79
- [41] Zhang D, Liang W, Yin C, et al. *OsC6*, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice. *Plant Physiol*, 2010, 154: 149-62
- [42] Zhang D, Liang W, Yuan Z, et al. Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development. *Mol Plant*, 2008, 1: 599-610
- [43] Ding J, Lu Q, Ouyang Y, et al. A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2654-59
- [44] Zhou H, Liu Q, Li J, et al. Photoperiod-and thermo-sensitive genic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA. *Cell Res*, 2012, 22: 649-60
- [45] Zhang H, Liang W, Yang X, et al. Carbon starved anther encodes a MYB domain protein that regulates sugar partitioning required for rice pollen development. *The Plant Cell*, 2010, 22: 672-89
- [46] Zhang H, Xu C, He Y, et al. Mutation in *CSA* creates a new photoperiod-sensitive genic male sterile line applicable for hybrid rice seed production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 76-81
- [47] Zhu X, Liang W, Cui X, et al. Brassinosteroids promote development of rice pollen grains and seeds by triggering expression of Carbon Starved Anther, a MYB domain protein. *Plant J*, 2015, 82: 570-81
- [48] 周海, 周明, 杨远柱, 等. RNase Z^{S1} 加工 Ub_{L40} mRNA 控制水稻温敏雄性核不育. *遗传*, 2014, 36: 1274
- [49] Yang Q, Liang C, Zhuang W, et al. Characterization and identification of the candidate gene of rice thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5* by mapping. *Planta*, 2007, 225: 321-30
- [50] Sheng Z, Wei X, Shao G, et al. Genetic analysis and fine mapping of *tms9*, a novel thermosensitive genic male -sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breed*, 2013, 132: 159-64
- [51] 赵敏会. 水稻光温敏核不育绵 9S 的遗传分析与基因定位[D]. 成都: 四川农业大学, 2012
- [52] Qi Y, Liu Q, Zhang L, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of the novel thermo-sensitive genic male sterility *tms9-1* gene in rice. *Theor Appl Genet*, 2014, 127: 1173-82
- [53] 王宝和, 徐建军, 吴银慧, 等. 水稻光温敏雄性核不育系广占63S不育基因*PTGMS2-1*的遗传分析与分子定位. *中国水稻科学*, 2010, 24: 429-32
- [54] Xu J, Wang B, Wu Y, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of *ptgms2-1*, the photoperiod-thermo-sensitive genic male sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2011, 122: 365-72
- [55] Zhou H, Zhou M, Yang Y, et al. RNase Z^{S1} processes UbL40 mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice. *Nat Commun*, 2014, 5: 4884
- [56] Zhang H, Hu J, Qian Q, et al. Small RNA profiles of the rice PTGMS line Wuxiang S reveal miRNAs involved in fertility transition. *Front Plant Sci*, 2015, 7: 514
- [57] Chen L, Liu YG. Male sterility and fertility restoration in crops. *Ann Rev Plant Biol*, 2014, 65: 579-606
- [58] Luo D, Xu H, Liu Z, et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nat Genet*, 2013, 45: 573-7
- [59] Veniamin S, Sawatzky LG, Banting GS, et al. Characterization of the peroxide sensitivity of COX-deficient yeast strains reveals unexpected relationships between COX assembly proteins. *Free Rad Biol Med*, 2011, 51: 1589-600
- [60] Itabashi E, Kazama T, Toriyama K. Characterization of cytoplasmic male sterility of rice with lead rice cytoplasm in comparison with that with Chinsurah Boro II cytoplasm. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 233-9
- [61] Kazama T, Itabashi E, Fujii S, et al. Mitochondrial ORF79 levels determine pollen abortion in cytoplasmic male sterile rice. *Plant J*, 2016, 85: 707-16
- [62] Hu J, Wang K, Huang W, et al. The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *Plant Cell*, 2012, 24: 109-220
- [63] Wang K, Gao F, Ji Y, et al. ORFH79 impairs mitochondrial

- function via interaction with a subunit of electron transport chain complex III in Honglian cytoplasmic male sterile rice. *New Phytol*, 2013, 198: 408-18
- [64] Huang W, Yu C, Hu J, et al. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 14984-9
- [65] Qin X, Huang Q, Xiao H, et al. The rice DUF1620-containing and WD40-like repeat protein is required for the assembly of the restoration of fertility complex. *New Phytol*, 2016, 210: 934-45
- [66] Oka H. Analysis of genes controlling F1 sterility in rice by the use of isogenic lines. *Genetics*, 1974, 77: 521-34
- [67] 北村英一. Studies on cytoplasmic sterility of hybrids in distantly related: varieties of rice, *Oryza sativa* L. Fertility of the F1 hybrids between strains derived from certain Philippine x Japanese variety crosses and Japanese varieties. *育種学雑誌*, 1962, 12: 81-4
- [68] Ouyang Y, Liu YG, Zhang Q. Hybrid sterility in plant: stories from rice. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 186-192
- [69] 马生健, 刘耀光, 刘金祥. 水稻的杂种不育研究进展. *植物遗传资源学报*, 2014, 5: 1080-8
- [70] 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*, 2015, 129: 1-13
- [71] 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: 1459-68
- [72] Sakata M, Yamagata Y, Yoshimura A. Two linked genes on rice chromosome 2 for F1 pollen sterility in a hybrid between *Oryza sativa* and *O. glumaepatula*. *Breed Sci*, 2014, 64: 309-20
- [73] Ikehashi H, Araki H. Screening and genetic analysis of wide-compatibility in F1 hybrids of distant crosses in rice, *Oryza sativa* L. *Tech Bull TARC*, 1987: 22
- [74] 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: 1439-51
- [75] Kubo T, Takashi T, Ashikari M, et al. Two tightly linked genes at the *hsa1* locus cause both F1 and F2 hybrid sterility in rice. *Mol Plant*, 2016, 9: 221-32