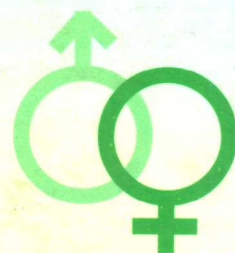


李竞雄 周洪生 主编

RECENT ADVANCES IN CROP MALE STERILITY AND HETEROSIS (I)

— NATIONAL CLIMBING PROGRAM "BASIC
STUDIES ON THE MALE STERILITY AND
HETEROSIS OF CEREAL, COTTON AND
OIL CROPS"



作物雄性不育 及杂种优势研究进展(I)

——国家攀登计划“粮棉油雄性不育杂种优势基础研究”

中国农业出版社

作物雄性不育及杂种优势研究进展 (I)

——国家攀登计划“粮棉油雄性不育
杂种优势基础研究”

RECENT ADVANCES IN CROP MALE STERILITY AND HETEROSIS (I)

——NATIONAL CLIMBING PROGRAM “BASIC STUDIES ON THE
MALE STERILITY AND HETEROSIS OF CEREAL, COTTON
AND OIL CROPS”

李竞雄 周洪生 主 编

中 国 农 业 出 版 社

作物雄性不育及杂种优势研究进展 (I)
——国家攀登计划“粮棉油雄性不育杂种优势基础研究”

李竞雄 周洪生 主编

* * *

责任编辑 舒 薇

中国农业出版社出版 (北京市朝阳区农展馆北路2号)
新华书店北京发行所发行 北京市通县曙光印刷厂印刷

787×1092mm16开本 13印张 8插页 293千字

1996年12月第1版 1996年12月北京第1次印刷

印数 1—1 000 册 定价 45.00 元

ISBN 7-109-04494-7/S·2788

内 容 提 要

本书是攀登计划“粮棉油雄性不育杂种优势基础研究”几年来研究进展的论文集,内容包括水稻、小麦、玉米、棉花、油菜等作物的雄性不育和杂种优势机理。主要从细胞水平、超微结构、分子结构、分子遗传学、群体遗传学和宏观网络学等方面着手,探讨细胞质雄性不育、细胞核雄性不育和杂种优势的表达、特征、基因定位、基因克隆、分子机理和应用途径。展示了我国在雄性不育研究方面的重大进展,指出了从分子水平攻克杂种优势和配合力这一百年难题的可能途径。本书主要是研究报告,也配有一些重要的综述性文章,基本体现了作物雄性不育杂种优势基础研究领域的国际水平,是研究这一领域的科研人员、大学生、研究生的重要参考书。

主 编 李竞雄 周洪生
副主编 闵绍楷 孙其信 汪若海 傅廷栋

前言

“粮棉油雄性不育杂种优势基础研究”是国家攀登计划30项基础研究项目中的一项，是1992年底通过国家科委论证起动的。本项目实行首席科学家领导下的专家委员会负责制，项目实施以来，首席科学家李竞雄院士不幸患重病长期住院，国家科委决定由鲍文奎院士代理首席科学家。本项目的计划目标是：从分子遗传、细胞发育、生化代谢、抗病分子基础等角度阐明五大作物细胞质和基因雄性不育的遗传机理，并研究核质互作、雄性不育与农艺性状包括致病性的联系或连锁、光温条件对不育性的稳定表达影响，以期为杂种优势利用提供简便有效、安全可靠的手段。在此基础上，结合数量遗传学研究资料，运用最新发展的分子标记技术，探明杂交亲本系之间的亲缘关系、有关优势基因的作用和表达，为今后选配亲本、求取一代杂交种最大生长优势和产品产量潜力指明方向和方法。

经过几年的努力攀登，目前已对五大作物多种类型的细胞质雄性不育和细胞核雄性不育进行了超微结构观察、同工酶分析、线粒体基因的表达、分离与克隆研究及核不育基因、恢复基因的定位研究。同时又采取多种方法发现、诱导和构建了不育系和恢复系。从分子遗传、细胞发育、生化代谢、抗病基础等角度对五大作物细胞质和基因雄性不育的遗传机理进行了探索，并研究了核质互作、雄性不育与农艺性状包括致病性的联系或连锁、光温条件对不育性影响，获得了较大的进展，向最终阐明雄性不育的机理迈出了一大步。同时，结合数量遗传学研究资料和最新的分子生物学技术，对杂交亲本系之间的亲缘关系、杂种优势的表达进行了有益的探索，取得了可喜的成绩。

杂种优势的机理是生物学中有名的难题之一，可称得上是生物学中的“哥德巴赫”命题。100年来一直未能解决。本项目在代理首席科学家鲍文奎院士的带领下，从混沌学理论入手，依靠最新的分子生物学技术，对这一难题进行了尝试性的研究，初步发现了解决问题的钥匙。

本项目实施以来，培养了一大批从事基础研究的年轻的高级人才，他们将成为这一领域的主力军。如果没有此项攀登计划，连队伍的稳定恐怕都谈不上，更无法取得以上成果。因此，国家设立此项攀登计划是十分正确、十分及时的。

本项攀登计划专家委员会鉴于以上原因，决定出版一本论文集，总结和反映项目的阶段性进展和成果。本书收集了课题研究的主要论文，既无法面面俱到，也不可能完美无缺，只求能体现项目进展的基本轮廓，给从事本领域研究的科研人员以启迪，开阔视野，活跃思维。将来随着项目的深入研究，可能还要出第二本、第三本。由于本项目属于探索性的工作，其中的观点不一定成熟，又由于编者的学识和编辑水平有限，其中的错误在所难免，敬请有识之士批评指正。

在本项目攀登的关键时期，代理首席科学家鲍文奎院士不幸去世，使得本项目失去了最优秀的舵手。我们怀着十分沉痛的心情谨以此书献给鲍文奎先生。

编者

1996年4月14日于北京

目 录

前言

第一部分 杂种优势研究

杂种优势机理探讨	杨金水 (1)
杂交水稻亲本基因的表达研究	程宁辉等 (13)
玉米 RAPD 程序优化研究及其初步探讨	傅骏骅等 (18)
激素和酶在棉花杂种优势表达中的作用	刘传亮等 (24)
棉花及其杂种光合速率的比较研究	汪 斌等 (29)

第二部分 细胞质雄性不育研究

甘蓝型油菜波里马细胞质雄性不育的发现、研究与利用	傅廷栋等 (35)
从甘蓝型油菜远缘杂种后代中选育雄性不育新材料	罗 鹏等 (42)
油菜波里马胞质雄性不育相关线粒体基因 orf224 在大肠杆菌中的克隆和表达	赵荣敏等 (46)
油菜异核型雄性不育选育途径的初步探讨	蔡 明等 (53)
玉米小斑病菌 C 小种毒素作用机理的研究	崔 洋等 (59)
玉米 CMS 材料线粒体 DNA 遗传多型性的研究	韦桂旺等 (71)
植物细胞质雄性不育性的分子基础研究	赖锦盛等 (82)
D ² 型小麦雄性不育系的育成及其特性的研究	吴郁文等 (89)
链霉素诱导小麦雄性不育的研究	刘志勇 孙其信 (94)
两种小麦细胞质雄性不育体系 mtDNA 的 RFLP 分析	牛芝霞等 (101)
小麦 D ² 型细胞质雄性不育系雄配子发育的 细胞形态学特征和同工酶的研究	刘春光等 (107)
不同细胞质雄性不育小麦亮氨酸氨肽酶活性和 叶绿素含量的初步研究	史红梅等 (114)
光周期敏感细胞质雄性不育小麦的研究	徐乃瑜等 (119)
普通小麦细胞质雄性不育系 85EA、89AR 亚显微结构的研究	洪吉松 王琳清 (130)
普通小麦细胞质不育系 85EA 和 89AR 雄性不育特性研究	王琳清等 (136)
两种不同类型水稻细胞质雄性不育系小孢子败育过程中 蛋白双相电泳研究	付彬璞等 (145)
棉花线粒体基因组和叶绿体基因组与	

胞质雄性不育 (CMS) 关系的 RAPD 研究	刘少林等 (149)
--------------------------------	------------

第三部分 细胞核雄性不育研究及其他

玉米核不育黄绿苗标记体系的构建	周洪生等 (155)
玉米雄性不育基因 ms10 小孢子败育的超微特征研究	孙荣锦等 (159)
玉米 S 组 CMS 育性恢复基因的分子标记定位	石永刚等 (163)
玉米核不育 ms1 花药发育的显微和超微特征研究	孙荣锦等 (170)
珍汕 97A 小孢子败育过程中 DNA 和蛋白质的变化	孙天恩等 (174)
小麦核不育性的遗传研究	刘秉华等 (180)
烟草花药特异启动子的克隆、活性测定及 雄性不育基因和恢复基因的构建	李胜国等 (186)
基因工程雄性不育烟草的获得	李胜国等 (192)
基因工程雄性不育烟草及其温度敏感性	李胜国等 (194)

CONTENTS

PART I STUDIES ON HETEROSIS

Research on Genetic Basis of Heterosis	Yang J S (12)
Molecular Mechanisms of Heterosis:	
Alteration of Gene Expression of Parental Lines in	
Hybrid Rice	Cheng N H et al. (16)
Studies on the Protocol Optimum and Preliminary	
Applification RAPD in Maize	Fu J H et al. (22)
The Effect of Hormones and Enzymes on the Expression of	
Heterosis of Cotton (<i>G. hirsutum</i> L.) Hybrid	Liu C L et al. (28)
A Comparative Study of Net Photosynthetic Rate between	
Tetraploid Cottons with Their Hybrids	Wang B et al. (32)

PART II STUDIES ON CYTOPLASMIC MALE STERILITY

Discovery, Study and Utilization of Polima Cytoplasmic	
Male Sterility in <i>Brassica napus</i> L.	Fu T D et al. (41)
A New Male Sterile Material of <i>Brassica napus</i> L. Obtained from	
Intergeneric Hybrid Progenies	Luo P (45)
The Cloning and Expression of ORF224 Gene Associated with Polima	
Cytoplasmic Male Sterility of <i>Brassica napus</i> L. in <i>E. coli</i> ...	Zhao R M et al. (51)
The Approach for Selection of Allo-Nucleus Male Sterility in	
Oilseed Rape (<i>Brassica napus</i> L.)	Cai M et al. (58)
Studies on Mechanisms of Action of <i>Helminthosporium</i>	
<i>maydis</i> (<i>Cochliobolus heterostrophus</i>) Race C Toxin	Cui Y et al. (70)
mtDNA Heterogeneity of Cytoplasmic Male Sterility in Maize ...	Wei G W et al. (80)
Molecular Basis of Plant Cytoplasmic Male Sterility	Lai J S et al. (87)
Breeding of Wheat Male Sterile Line with <i>Aegilops Crassa</i> (6x)	
Cytoplasm and Research of Its Characters	Wu Y W et al. (93)
Study on the Antibiotics-Induced Male Sterility in Wheat	Liu Z Y et al. (99)
RFLP Analysis of mtDNAs of Two Types of Cytoplasmic	
Male Sterility in Wheat	Niu Z X et al. (106)
Studies of Cytomorphosis During Development of Pollen	
Grains and Isozymes in D ² -Type CMS Line	Liu C G (113)

The Preliminary Study of the Activities of Leucine Aminopeptidase and Chlorophyll Content of Different Types of Cytoplasmic Male Sterile Wheat	Shi H M (117)
Studies on Photoperiod-Sensitive Cytoplasmic Male Sterility in Wheat	Xu N Y et al. (128)
Ultra-Structural Studies on Cytoplasmic Male Sterile Lines 85EA, 89AR of Wheat	Hong J S et al. (135)
Study on the Male Sterility of CMS Lines of 85EA and 85AR in Common Wheat	Wang L Q et al. (144)
Two Dimensional Gel Electrophoresis Analysis of Proteins of Different Pollen Developing Stages from Two Types of CMS Lines	Fu B Y et al. (148)
Study of Mitochondria and Chloroplast Genome Affecting Cotton Cytoplasmic Male-Sterility (CMS) Using RAPD	Liu S L et al. (153)

PART III STUDIES ON NUCLEAR MALE STERILITY AND OTHERS

Construction of Genic Male Sterile System Marked by Yellow-Green Seedlings	Zhou H S et al. (157)
The Ultrastructure of Developmental Anthers of Genic Male Sterile ms10 in Maize (<i>Zea mays</i> L.)	Sun R J et al. (161)
Mapping CMS-S Restore Gene Rf ₃ with RFLPs and RAPDs	Shi Y G et al. (169)
Study on Microstructural and Ultrastructural Development in Anthers of Male Sterile Gene ms1 in Maize (<i>Zea mays</i> L.)	Sun R J et al. (173)
The Change of DNA and Protein in the Process of Microspore Abortion in Zhenshan97A	Sun T E et al. (178)
Genetic Study of Genic Sterility in Wheat	Liu B H et al. (185)
Biological Activity Assay of Tobacco Anther-Specific Promoter and Construction of Chimeric Genes Confering Plant Male Sterility and Male Restoration	Li S G et al. (191)
Male Sterile Tobacco Plants Obtained by Genetical-Engineering	Li S G et al. (193)
Genetical Engineered Male Sterile Tobacco Plants and Their Sensitivity to Temperature	Li S G et al. (199)

第一部分 杂种优势研究

杂种优势机理探讨

杨金水

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

摘 要

本文介绍了近年来国际上采用分子标记对玉米和水稻基因组杂合性与杂种优势关系进行 QTL 分析所获得的结果,对玉米杂种优势以超显性为主,水稻杂种优势以显性互补为主的结论进行了分析与讨论。综合目前有关基因组结构与杂种一代基因表达调控的研究资料,从基因组多态性与基因多态性的结构与功能角度进一步阐明关于基因网络系统的观点。本文认为决定杂种优势配合力的遗传基础在于最佳基因群组合。杂合性适应性杂种优势是自然选择的结果,基因型的协调是杂种优势形成的基本前提。等位基因成员的差别主要在于控制基因表达的非编码顺序,等位基因成员在不同的基因网络系统中工作效能不同。由 mRNA 放大技术揭示的玉米与水稻杂种一代亲本基因的表达改变,其原因涉及转录调控系统及基因的调控区。并对基因网络系统与杂种优势的关系的研究,提出了一些可行的方法与策略。

关键词: 杂种优势, 基因组与基因多态性, 基因网络系统

两个遗传基础不同的亲本杂交所得到的杂种一代在生长势、存活力、生殖力和抗逆性等方面优于双亲的现象称为杂种优势。杂种优势是生物界普遍存在的一种现象,是生物对环境适应的自然选择的产物。

人类对杂种优势的利用,可以追溯到2000年前,当时中国人用母马和公驴交配获得体力强大的杂种——役骡。到17世纪中叶,德国学者克尔罗伊首先认识到植物中烟草、石竹、紫茉莉、曼陀罗等属的不同种间的杂种优势。1876年,达尔文在《植物界异花授粉和自花授粉的效果》一书中总结了许多植物变种和品系间的杂交和自交实验结果,得出杂交对植物有益,自交对植物有害的结论(李竞雄 1983)。1900年孟德尔定律重新发现后,使杂种优势的研究和应用得到进一步发展。到目前为止,杂种优势已在众多的生产领域得到广泛利用,取得了巨大的经济效益,特别是我国杂交水稻的应用与推广,可说是20世纪农业生产中一项举世瞩目的伟大成就。

尽管杂种优势的利用在生产实践中取得了辉煌的成就,但在杂种优势理论研究方面,却远远滞后于实践。自布鲁斯(Bruce)和沙尔(Shull)分别提出显性假说和超显性假说至今近一个世纪的历史中,杂种优势的理论研究并无实质性进展,所有对杂种优势机理的阐述与说明都以这两个假说为基本依据。大量的试验证据表明,无论是显性假说或是超显性假说,都能对杂种优势的部分现象作出合乎逻辑的解释,但均存在无法摆脱的理论上的不足

(李竞雄等 1995)。例如显性假说认为,杂合子优于双亲是因为显性基因对不利隐性基因的掩蔽及显性基因的加性效应。对一些受单基因或少数基因控制的性状,显性假说的解释是行得通的。但显性假说无法解释为何两个自交系的杂种一代可大大超过双亲,亦无法说明杂种优势中的数量性状的表现行为。超显性假说以等位基因杂合性为主要出发点,认为等位基因的互作(包括上位性)产生的表型效应超过纯合的等位基因,优势主要取决于双亲基因型的杂合状态。超显性假说对一些亲缘关系较远,生态类型差别较大的生物类群之间的杂交超亲现象,特别具有说服力。但在常规的遗传育种中,通过聚合改良或性状渗入往往可以筛选到一些遗传上较为纯合的品系,其性状常常优于亲本的杂交种。按照超显性假说,这是不可能产生的。

显性假说与超显性假说的基本出发点是互相排斥的。按照显性假说,只要保证足够大的 F_2 代群体,理论上完全可以获得所有显性基因纯合的个体,因此杂种优势是可以固定的,只是实践中难以实现而已。按照超显性假说,除非双亲基因型处于杂合状态,否则杂种优势是不可能产生的。到目前为止,人们对这两种假说仍无法作出最后判断,有待于继续深入研究。

1. 显性假说与超显性假说的分子验证

近年来由于分子生物学和分子遗传学的发展,国内外已有许多实验室采用新的生物技术,试图从分子水平上探索杂种优势的形成机理,其中以玉米和水稻的研究较为突出。

(1) 玉米杂种优势中的超显性 细胞在减数分裂时可以发生姐妹染色体的同源配对与交换,这是基因重组的细胞学基础。杂合子中同源配对的染色体区段 DNA 顺序有些是异质性的,或者说 DNA 顺序存在差异。这种同源区域 DNA 组成的差异可以通过限制酶酶切产生的片段大小予以揭示,这就是现在所谓的 RFLP,又称限制酶片段长度多态性。在染色体的不同区段,可以找到许多表现亲本多态性的片段,它们一般有两个特征:①处于染色体上的位置相对固定;②同一亲本多态性片段特征相同。这种 DNA 片段可作为一种分子标记,用以分析不同亲本之间同源部位染色体的组成和杂种子二代个体同源部位的杂合状态。由于 RFLP 标记可与邻近基因位点紧密连锁,当邻近的基因位点参与杂种优势的形成时,通过子二代基因重组的分析,即可探知该位点对杂种优势的贡献。

Stuber 等(1992)最先报道了应用 RFLP 分子标记进行玉米杂种优势的遗传机制分析。他们选择2个商用杂交种生产的自交系 B73和 Mo17配制杂种一代。从杂种一代自交产生的 F_2 代群体中,随机挑选264个单株经自交建立264个 F_3 株系。以 F_3 株系为基础建立了3个试验群体:①单株自交选10个 F_4 单株用以分析 F_3 亲本基因型;② F_3 株系分别与自交系 B73和 Mo17回交,建立2个对应的回交杂合群体观察杂种优势表现。大田试验分6个地区进行,栽种密度保持一致。对6个性状进行统计分析,包括产量、株高、穗叶面积、抽穗期、籽粒含水量(grain moisture)和每株穗数。选用可覆盖90%—95%玉米基因组的76个 RFLP 分子标记用于位点多态性组成分析。采用单标记和间距作图法(interval mapping method)区分数量性状。田间试验和室内分子实验比较分析显示,影响玉米产量性状的遗传因子几乎涉及所有10个玉米染色体,表现明显的数量遗传。控制株高,叶面积的数量基因处于产量 QTL 位置附近。单株穗数 QTL 位点与籽粒产量 QTL 位点相似性较少。试验结果得出以下结论:①凡是影响产量的 QTL 位点,杂种优势的表现与基因组杂合性呈正相关;②2个回交群体中,决

定产量性状的染色体位置大致相同；③大多数数量性状在杂合子中表现超显性。因此 Stuber 等认为，玉米中决定产量的数量性状杂种优势与位点杂合呈正相关（相关系数为0.68）。单一位点控制的性状，表型与杂合性相关性较少。随着性状涉及位点数的增加，表型与位点杂合性相关系数增加，表现为显性和加性效应共同作用。

(2) 水稻杂种优势中的显性互补 水稻是第二个采用 RFLP 分子标记进行数量性状杂种优势遗传基础分析的作物。Xiao 等（1995）采用类似于 Stuber 等设计的试验方法，研究了与水稻产量有关的一系列数量性状杂种优势与位点杂合性的关系。他们选择了12个涉及水稻产量的性状进行田间观察与室内分子标记多态性分析。选用的2个自交系分别为籼型水稻9024和粳型水稻 LH422。杂交配组后，从子二代随机挑选194个F₂代自交系分别与9024和 LH422亲本回交建立2个杂合体群体，各含194个回交系。12个数量性状分别为株高、抽穗期、成熟期、穗长、单株穗数、每穗小穗数、单穗粒数、结实率、千粒重、单株穗数、单株总粒数和谷粒产量。共有141个 RFLP 分子标记用于位点杂合性分析，涉及37个 QTL 位点。该小组获得的结果如下：谷粒产量显示最强的杂种优势，高于最好亲本20.67%；其它性状好于亲本的依次为，千粒重（10.1%）、株高（9.9%）、穗长（5.0%）、熟期（3.2%）；单株粒数、结实率、单株穗数显示优势，但不显著；抽穗期无优势；每穗小穗数（-16.3%）和每穗粒数（-12.1%）表现负优势。QTL 位点相关性分析揭示，籼型回交群体（BC/I）中，株高涉及5个 QTL，其中3个与杂合性正相关，2个与杂合性负相关；粳型回交群体（BC/J）中，3个 QTL 与株高有关，其中2个为杂合性正相关，1个为负相关；抽穗期，BC/I 中2个 QTL 杂合性使抽穗期提前，BC/J 中2个 QTL 杂合性使抽穗期延长；成熟期，1个 QTL 为杂合性正相关（缩短），另一个为负相关（延长）；穗长，控制穗长的2个 QTL 位点杂合性与表型正相关；单株穗数，只有1个 QTL 与之相关，杂合性导致穗数减少；每穗小穗数，BC/I 群体中有1个杂合性使小穗数增加，BC/J 群体中2个 QTL 与小穗数有关，杂合状态下1个引起小穗数增加，另1个则相反；每穗粒数，BC/I 群体中2个 QTL 杂合性均使穗粒数增多，BC/J 群体中1个 QTL 使穗粒数增加，另一个使之减少；结实率由2个 QTL 控制，杂合性可提高结实率；BC/I 群体中有3个 QTL 与千粒重有关，其中1个杂合性降低千粒重，另2个增加千粒重，而 BC/J 群体中，4个 QTL 涉及千粒重，其中3个杂合性增加千粒重，1个则相反；与单株小穗数有关的 QTL 位点仅在 BC/I 群体中发现，共有3个，其杂合态均可使小穗数增多；决定单株粒重的 QTL 位点在 BC/I 群体中有3个，其杂合性均使单株粒重增加，BC/J 群体中有2个 QTL 位置与单株粒重有关，但杂合性均使粒数减少；有2个 QTL 涉及谷粒产量，1个在 BC/I 群体的8号染色体，另一个在 BC/J 群体中也位于8号染色体，这2个 QTL 的杂合性均使谷粒产量降低，其原因可能与小穗不育有关。在统计的37个 QTL 位点中，有27个 QTL 位点都只在一个回交群体（BC/I 或 BC/J）中检测到，其中82%在杂合状态性状表现优于对应的纯合子。其余10个 QTL（占总数27%）则在2个回交群体中发现，但 these QTL 位点的杂合性的表型值均落在双亲之间，没有发现其中有优于双亲的组合。因此 Xiao 等认为，水稻杂种优势与整个基因组的杂合性不存在相关性。特别是在 F₂代自交系中筛选到一些重组株系，其综合表型优于2个自交系亲本的杂种一代，这进一步证明，水稻杂种优势主要取决于亲本基因的显性互补。

对水稻与玉米杂种优势遗传机理的差别，Xiao（1995）提出有两种可能：①玉米中确实

存在杂合状态下可以形成超显性等位的基因；②由于目前 QTL 分子标记分辨力的限制，无法区分紧密连锁的显性和隐性基因，当它们在杂合子中处于互补显性状态时，其表现类似于超显性实质上是一种假性超显性 (pseudo-overdominance)。假性超显性的原因可从玉米和水稻生殖生物学的差异予以合理的解释。玉米是一种异交作物，自由传粉的结果使同一生态群的孟德尔群体产生大量的杂合体，由于显性基因的掩蔽作用，大量的不利的隐性基因可以逃避自然选择的压力保留下来，并在漫长的进化过程中或多或少地与显性基因产生紧密连锁。水稻是一种比较严格的自花授粉作物，在自然与人为选择条件下，大量不利的隐性基因在进化过程中不断暴露与淘汰，加速了有益的显性基因的累积。根据上述推测，玉米的超显性实质上是一显性互补，只是由于大量隐性基因与显性基因紧密连锁程度太强，以致于常规的杂交方法和基因重组无法打破这种连锁，从而分辨不出隐藏在超显性背后的显性互补效应。目前要从实验上证明上述解释还十分困难，除了成倍地扩大杂交分离后代的群体之外，还找不到合适的办法来确证这种紧密连锁的存在。此外，这种紧密连锁关系在生物学上的意义是什么，也是一个待解之谜。

2. 遗传多态性和杂种优势

显性假说或超显性假说的基本前提都要求亲本之间存在遗传的异质性，即二个亲本的基因型存在差异。基因型差异是生物多态现象的遗传基础。对生物多态性产生的原因，杜布赞斯基曾在《遗传学与物种起源》一书中进行了详尽的分析与论述。杜氏谈到“一个种内的多样性，都增加了生物利用环境资源的效率。一个单一的基因型，无论它怎样地多能，总不能在所有的环境中都尽其最高的效率。所以自然选择保持了各种各样的基因型，它们或多或少是专门的，致使有机体只有在生活环境的一定范围内才是适宜的。”生物适应环境多态性的能力可以通过遗传机制相对固定下来，这方面研究最为详细的例子为果蝇的染色体逆位。所谓染色体逆位，系指基因在染色体上的排列方向发生改变，如 ABCDEFHGI 中位于当中的一段染色体发生逆位使排列顺序变成 AEDCBFHGI。杜氏发现，几乎所有的果蝇生态群中都存在染色体逆位，并与其生态环境相互对应。染色体逆位的直接效应是可抑制位段内基因之间的交换与重组，使有益的基因群组合得以保存并进一步巩固。在植物中，不同的生态类型可通过染色体逆位，但更多地是染色体易位将一些高度适应的基因群组合加以固定。任何一个物种的单一的基因型，都不可能尽善尽美地利用或者适应生态环境，而生态环境又始终在或多或少地、缓慢地或者剧烈地发生变化。要适应这种多变的生态环境，产生一种具有更为丰富内容的基因型的杂合体，是一种最为合理的选择。因此杂种优势是生物适应自然选择的一种方式，也是自然选择作用于生物的必然结果。人们在研究不同生态类群的果蝇中发现，不同基因型个体之间的杂交，一般都可产生具有更高适应值的杂合体。在大多数的生物的孟德尔群体中，杂合子均占有较高的比例。从这一意义上说，产生杂种优势的能力是生物的一种本能。

(1) 玉米基因组的变异与杂种优势的关系 基因型的变异在分子水平上可表现为 DNA 含量的变化和 DNA 顺序的重排。Rayburn 等 (1990) 收集了美国西南部印第安玉米不同海拔高度生态类群的样品，通过细胞核 DNA 含量的分析研究基因组的组成差异，结果如下：

编号	海拔高度 (m)	细胞核 DNA (pg/4c)	Duncans 分组
218163	1 616.5	13.5	A
218162	1 616.5	13.4	A
218177	1 311.5	13.2	AB
218174	1 311.5	13.0	AB
218175	1 311.5	12.8	ABC
218161	1 616.5	12.3	CD
218180	701.5	12.0	DE
218179	701.5	11.7	DEF
218187	91.5	11.6	EF
218189	30.5	11.1	F
218181	701.5	11.1	F

随着海拔的升高,基因组 DNA 的含量相应增加,变化幅度最高可达38.8%。显然基因组 DNA 含量或基因组大小变异与生态环境适应性密切相关。为了探明基因组组成与杂种优势的关系, Rayburn 等 (1990) 设计了2组杂交试验。第一组,从10个自交系中选出2个高含量核 DNA 自交系与2个低含量核 DNA 自交系,其 DNA 含量相差11%。将这4个自交系两两杂交,比较杂种一代与亲本 DNA 含量的变化。几乎所有组合中, F_1 代核 DNA 与亲本核 DNA 含量的中间值无显著差异,但也有部分组合 F_1 表现基因组大小的变异,其分布范围从倾向低含量亲本到倾向高含量亲本。这些结果说明,在玉米杂交组合中,确实存在 F_1 核 DNA 含量的不稳定性。第二组,只考虑杂种一代表现杂种优势的组合,暂不计较亲本核 DNA 的含量。在供试的14组杂交组合中,其中9个 F_1 核 DNA 含量与亲本中间值基本一致,另5个组合则显著高于亲本平均值。这说明某些组合中杂种优势可能涉及基因组组分的变异,一般趋势为含量增加,变化的原因不得而知。

(2) 染色体逆位多态性杂种优势 在大多数果蝇染色体逆位多态型类群之间或个体之间,其杂合体通常都具有适应性杂种优势。但在研究中发现,当染色体是来自地理上遥远的群体时,逆位杂合体只有少数情况下表现出杂种优势;多数情况中,杂合体的适应值仅处于2种纯合体亲本适应值之间,有时只和生活力最小的纯合体相等(杜布赞斯基)。对于这种现象,杜布赞斯基解释为,具有不同基因排列的染色体,其上载有不同的基因复合体。这些处于一定生态环境的基因复合体,经过长期的自然选择已经互相调和或互相“适应”,使逆位杂合体具有高度的适应值。但是在具有相同或不同的基因排列染色体上的基因,在不同地方是不相同的。由不同地方的基因复合体组成的杂合体,没有经过自然选择形成彼此互相适应的机制,因此不表现对环境适应的杂种优势。这一点在鲍文奎先生长期从事的小黑麦远缘杂交中已得到有力的证明(鲍文奎 1990)。杜氏的上述观点,对于我们观察和分析作物的杂种优势具有重要的指导意义。至少可以给我们以下的启示:①在特定生态环境下自然选择产生的杂种优势具有一定的取向,例如在气候恶劣、缺乏养分的生态环境与气候适宜、养分充足的环境,其杂种优势发展的方向是绝不相同的,与此相应的遗传机制亦有很大的差别;②2个不同的基因型产生具有适应性的杂种优势。其基本前提是2个基因复合体在杂合子

中彼此协调。比如2个不同的基因型在杂合细胞中，可能有效地利用对方的或者自身的转录装置进行基因的表达与调控，亦有可能只有一方的转录装置可以利用，而另一方则受到抑制，前后两种情况产生的结果是极不相同的。

从染色体多态性与适应值的比较分析可以看出，杂合性是否具有竞争性杂种优势，至少取决于三个基本条件：①基因的排列组合；②染色体上各等位基因的功能；③不同基因型彼此的协调程度。上述各点又与长期的自然选择密切相关。

3. 基因多态性的分子结构

现代遗传学起源于孟德尔的等位基因遗传研究。生物多样性的基础，最根本的在于基因的多态性。现代分子生物学的发展，已使人们可以从分子水平上了解基因多态性在结构与功能上的差异及其产生的原因。

(1) 植物 rRNA 基因的多态性 所有的生物细胞都含有核糖体，它是生物合成蛋白质的唯一场所。核糖体由大小2个亚基组成，每一亚基均含蛋白质和 RNA (rRNA)。核糖体大亚基含3种 rRNA，即28s rRNA、5.8s rRNA 和5s rRNA，小亚基含1种 rRNA，即18s rRNA。真核生物中编码28s rRNA、5.8s rRNA 和18s rRNA 的基因共同组成一个转录单位，受控于同一个启动子，其结构如图1-1所示

图1-1中 NTS 为非转录区，含启动子和增强子；ETS 为外间区，转录后被加工切除；ITS 为内间区，空白部位转录后被切除；曲线表示转录方向。已

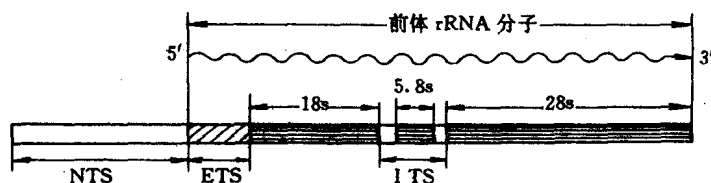


图 1-1

经研究过的几乎所有真核生物中，编码 rRNA 分子的转录单位均以串接方式首尾相连，簇集于染色体的一定区域，由许多重复拷贝组成，又称核仁组织中心(nucleolar organizer)。大量研究表明，真核生物的不同生态类型中，rRNA 基因的多态性十分丰富。主要表现在两方面，即拷贝数的变化和转录调控区的差异，编码区顺序则相当保守。Govindaraju 等 (1992) 分析了美国新泽西州8个小生态区松树 (pitch pine) 群体 rRNA 基因组成时发现，生态群之间 rRNA 基因拷贝数可相差21倍，群体内个体之间的差异达12倍，变化幅度在355—7 356个拷贝之间。高海拔生态型松树含较少拷贝 rDNA (1 434)，而低海拔生态型含高拷贝 rDNA (5 416)。另一项关于蚕豆 rRNA 基因多态性研究 (Rogers 1987) 也证实，不同群体之间拷贝数相差95倍，个体之间相差12倍。此外，亚麻中也发现株型较高的含 rRNA 基因拷贝数多，而较矮的拷贝数少。玉米、大麦中也存在类似现象。

rRNA 基因转录调控区的多态性也丰富多样。不同生物种属 rRNA 基因调控区有一共同特征，即含许多亚重复单位，它们是重要的转录控制元件。墨西哥黑色甜玉米 (BMS) 的 NTS 区含10个亚重复序列，各由165—232个核苷酸组成，同源率为 92%—96%。美洲大陆的3种可可树生态型 Criollo、Forastero、Trinitario (Laurent 1993) 的 rRNA 基因可分为三个类型 A、B、C，其主要差别也在于 NTS 区的顺序组成。Cordess 等 (1990) 收集了105份水稻材料，其中包括58个栽培稻，47个野生稻。比较各生态型 rRNA 基因的差异，他们发现

水稻 rRNA 基因多态性差别主要在 NTS 区的亚重复序列数目不同。水稻 rRNA 基因 NTS 区亚重复序列长 300bp, 共有 8 种重复类型。典型的梗稻重复单位较少, 典型的籼稻亚重复序列较多, 过渡类型则介于籼梗之间。水稻 rDNA NTS 中亚重复序列根据重复数多少可分 8 种类型, 不同的生态类型可含其中 1 种或数种重复类型。如籼稻 chinsurah-boro II 即含 45% 的 4 型重复序列和 55% 的 5 型重复序列, 典型的梗稻 Cigalon 只含量少的 1 型重复序列。植物 rRNA 基因多态性的生物学意义目前还不太清楚。

(2) 玉米的基因多态性 单拷贝或低拷贝编码蛋白质的基因也发现存在结构上的多态性。Jones 等 (1983) 曾报道过玉米 Adh1 (乙醇脱氢酶) 基因的多态性差异。Adh 是糖酵解过程中的一个酶, 在淹水或无氧状态下可诱导表达。玉米有 2 个 Adh 基因, 其中 Adh1 基因位于玉米 1 号染色体长臂 (IL) 距离端部 127cM 位置, 截止 1977 年, 已知有 350 个形态可明显区分的玉米种族 (race)。Jones 等 (1983) 选取了 7 个已知在 Adh1 位点存在差异的等位基因品系进行 RFLP 多态性比较。一共采用了 7 个限制酶处理植株总 DNA, 以 Adh1 基因特异顺序为探针与限制酶 DNA 片段杂交。在 7 个品系中有 6 个表现明显的多态性, 差异片段全都位于基因编码区的两侧, 亦即与基因表达调控有关的区域。涉及 Adh1 的编码顺序则相当保守, 这与蛋白质功能有关。另外, 在 6 个玉米自交系中, 也发现 sh1 位点存在类似 Adh1 的多态性结构。

玉米 R 位点也是一个典型的基因多态性例子。R 位点同玉米不同组织器官花青素形式有关, 在不同生态类型与品系中已发现近 100 个 R 等位基因。已知标准的 (“standard”) R 位点负责玉米籽粒糊粉层、花药和胚芽鞘色素的形成, 含 2 个紧密连锁的 R 基因家族成员 S 和 P。S 负责糊粉层色素产生, P 与花药和胚芽鞘形成色素有关。如 R 位点发生重复与变异, 可产生新的家族成员, 如 Lc。Lc 基因负责玉米叶脉、叶舌、叶耳、颖片、苞叶和果皮的色素形成。由 DNA 测序得知, S、P 和 Lc 都编码一个相同的蛋白质, 其功能类似转录激活因子螺旋 (helix-Loop-helix) 蛋白, 涉及花青素生物合成基因的转录。比较 S、P 和 Lc 基因结构发现, 其编码顺序基本一致, 所不同的只在编码区以外的区域。

基因多态性的结构变异也在果蝇不同种间热激蛋白位点 (heat shock loci) 发现。变异特点类似于玉米 Adh1, 即转录区很少变化, 主要的差异在于编码区之外。

虽然仅凭上述有限的例子还难以得出普遍性的结论, 但也不无理由推测基因多态性的结构差异主要存在于调控区的可能。这一现象从生物学的角度理解不困难, 因为调节基因的表达与改变基因的编码顺序两者相比, 前者更能灵活地适应自然选择的要求。当然这并不排斥编码区发生微小的变化以改变蛋白活性的可能。如果这一现象适合于大多数的等位基因, 那么杂合子等位基因的差别只在于表达水平的差异。当其中一个等位基因表达水平趋于零时, 我们可将其视为一个突变的无功能的基因, 在合适的条件下, 它们仍可恢复正常的表达。

4. 杂合子中的基因表达与调控

两个基因型不同的亲本杂交, 子一代在许多表型上不同于双亲, 显然涉及到亲本基因在杂种遗传背景下表达调控的变化。这种变化甚至可在细胞学上观察到。

Navashin (1952) 在研究还阳参属 (*Crepis*) 不同种间染色体组型时发现, 每个种都有

一个D染色体。在细胞分裂中期,D染色体的短臂近端部形成一个次级缢痕(secondary constriction)并在尾部携带一个随体(satellite),这是D染色体的固有特征。不同种的D染色体形态略有不同,可彼此区分。D染色体次级缢痕与随体的形成是由遗传控制的,同一物种二倍体同源D染色体形态相同。当两个不同的种(*C. capillaris*和*C. neglecta*)之间杂交时, F_1 代来自*neglecta*的D染色体将消失原有的次级缢痕及随体,只有*capillaris*保持原有的D染色体形态特征(Wallace 1971),这一现象被称之为双型差显(differential amphiplasty)。与之相应的是,在细胞核静止期, F_1 杂种只有一个种形成核仁,另一个种的核仁消失。当以*neglecta*回交时,纯合的*neglecta*二倍体D染色体又恢复原有形态。原因是*neglecta*D染色体在种间杂种一代受到抑制,失去缢痕与随体生成能力。同一现象已在动物中发现,并证实系由等位基因的受抑而致。

(1) 爪蟾核仁显性的分子基础 早在70年代初人们即已发现,由爪蟾的两个种*X. laevis*和*X. borealis*交配产生的杂种胚,无论正反交,杂种细胞都只出现*X. laevis*的核仁,这一现象被称为核仁显性(nucleolar dominance)。核仁的出现表示细胞核rDNA正处于活跃的转录,核仁显性则意味着杂种细胞中只有*X. laevis*的rRNA基因表达,*X. borealis*的rRNA基因受到抑制。爪蟾的rRNA基因结构与前面图示的类似,也有一个控制rRNA基因表达的启动子区,即NTS区。研究发现*X. laevis*和*X. borealis*两个种的rRNA基因编码顺序相同,差别主要在NTS区。爪蟾rDNA的NTS区含有许多由60bp和80bp混合组成的重复序列,或称60/80bp亚重复子。60/80bp亚重复子的作用类似增强子(enhancer),可与启动子共同作用决定rRNA基因的转录。在*laevis*种中,rRNA基因的NTS区含17个以上的60/80bp重复序列,而*borealis*仅有4个60/80bp重复序列。

Reeder等(1984)设想,爪蟾的核仁显性可能与rRNA基因的竞争性转录有关。为此他们以rRNA小基因为基础,构建了一系列含有不同拷贝数的60/80bp序列的重组质粒。将这些NTS区长度不同的重组质粒两两组合注射到爪蟾同一卵母细胞核中,借助连接在基因启动子下游的特异顺序检测基因转录产物的数量。结果显示,长NTS区质粒的表达程度大于短NTS区质粒表达。由此设想长NTS区中较多拷贝的60/80bp重复序列在基因启动子活化的过程中,具有更强的与转录因子结合的竞争能力,从而导致优先表达,这就是核仁显性的分子基础。

另一项关于老鼠和人杂种细胞中rRNA基因的表达研究也证实在爪蟾种间杂种中发生的现象。Miesfeld等(1984)发现大多数人、鼠杂种细胞中只有老鼠的rRNA基因表达,人的rRNA基因受到抑制。进一步研究发现,人、鼠杂种细胞中只含有适合老鼠细胞的专一性转录因子D,而缺少适合人细胞rRNA基因表达的转录因子。如果将纯化的人细胞转录因子D注射到人、鼠杂种细胞中,人细胞rRNA基因即可恢复表达。上述实验说明,人鼠杂种细胞中rRNA基因的显隐性状态并非取决于rRNA基因,而决定于转录因子基因的显隐性。人鼠杂种细胞中,人细胞转录因子表达受阻,而老鼠细胞转录因子D又不能识别人细胞rRNA基因调控区,结果造成老鼠细胞rRNA基因的显性表达。

上述两个例子说明,即使同一类rRNA基因,在不同的遗传背景下其显隐性的状态亦可通过不同的遗传机制产生。

(2) 玉米和水稻杂种一代亲本基因的表达与调控 从杂种一代的表型可以推测,杂合