

林强, 郑燕梅, 张建福, 等. 水稻 CMS-WA 微效恢复基因的遗传分析 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (9): 872-875.
LIN Q, ZHENG Y-M, ZHANG J-F, et al. Genetic Analysis for Minor Effect Restoring Gene for CMS-WA in Rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28 (9): 872-875.

水稻 CMS-WA 微效恢复基因的遗传分析

林 强^{1,2,3,4,5}, 郑燕梅^{1,2,3,4,5}, 张建福^{1,2,3,4,5}, 谢华安^{1,2,3,4,5}

(1. 福建省农业科学院水稻研究所, 福建 福州 350019; 2. 农业部华南杂交水稻种质创新与分子育种重点实验室/福州国家水稻改良分中心/福建省作物分子育种工程实验室/福建省水稻分子育种重点实验室, 福建 福州 350003; 3. 福建省作物种质创新与分子育种省部共建国家重点实验室培育基地, 福建 福州 350003; 4. 水稻国家工程实验室, 福建 福州 350003; 5. 杂交水稻国家重点实验室华南基地, 福建 福州 350003)

摘要: 为分析水稻育性微效恢复基因的表型遗传, 以套袋自交结实率、嵌合颖花率和黑染花粉率为指标考查野败型 (WA) 不育系珍汕 97A、龙特浦 A 和京福 1A 的育性在 3 个转育高世代中的表现。研究结果: 黑染花粉粒的出现与微效恢复基因有关, 导致不育系自交结实, 从而产生杂株; 采取遗传提纯等方法可以排除部分微效恢复基因, 达到提纯和去杂的目的, 若要完全将其排除, 在理论和实践上是不可能的; 嵌合颖花率适合作为微效恢复基因遗传分析的量化指标, 为进一步研究其分子遗传提供基础。

关键词: 水稻; 野败型; 细胞质雄性不育系; 育性

中图分类号: S 511

文献标识码: A

Genetic Analysis for Minor Effect Restoring Gene for CMS-WA in Rice (*Oryza sativa* L.)

LIN Qiang^{1,2,3,4,5}, ZHENG Yan-mei^{1,2,3,4,5}, ZHANG Jian-fu^{1,2,3,4,5}, XIE Hua-an^{1,2,3,4,5}

(1. Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350019, China;
2. Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding of Hybrid Rice for South China, Ministry of Agriculture, P. R China/Fuzhou branch, National Rice Improvement Center of China/Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding/ Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding, Fuzhou, Fujian 350003, China; 3. Incubator of National Key Laboratory of Fujian Germplasm Innovation and Molecular Breeding between Fujian and Ministry of Sciences & Technology, P. R. China, Fuzhou, Fujian 350003, China; 4. National Rice Engineering Laboratory of China, Fuzhou, Fujian 350003, China; 5. South China Bases of National Key Laboratory of Hybrid Rice for China, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: For the genetic analysis of minor effect restoring gene in rice, the CMS lines of Zhenshan 97A, Longtepua A and Jinfu 1A with different fertile levels were used as materials to investigate three sterility indexes, bagged seed setting rate, dark pollen rate by I₂-IK dyed and rate of florets with fertile anthers. The results showed that the appearance of abnormal plants in CMS-WA was due to partial restoration of self-fertility few floras caused by minor effect restoring gene. Adopted the method of genetic improvement could eliminate part of minor effect restoring gene to get purification and elimination, but not completely ruled out. This index of rate of florets with fertile anthers could be use as a suitable tool to study heredity laws of minor effect restoring genes and its further molecular mechanism.

Key words: rice; wild abortive; cytoplasmic male sterile line; restoring gene with minor effect

收稿日期: 2013-07-01 初稿; 2013-07-27 修改稿

作者简介: 林强 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事水稻分子育种研究 (E-mail: stronglin@126.com)

通讯作者: 张建福 (1971-), 男, 博士, 研究员, 主要从事水稻分子生物学与分子育种研究 (E-mail: jianfzhang@163.com)

谢华安 (1941-), 男, 研究员, 中国科学院院士, 主要从事水稻遗传育种研究 (E-mail: huaanxie@yahoo.com.cn)

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2011J01106); 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) 项目 (2010CB723003); 国家水稻产业技术体系项目 (CARS-01-11); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD-1-1301)

野败型细胞质雄性不育系 (CMS-WA) 属于籼稻亲缘系统, 是三系杂交稻最早应用的不育系类型之一, 由于其不育性稳定, 可恢性较好, 多年来配制组合的应用面积在杂交稻生产中居于主导地位^[1]。应用较广的 CMS-WA 如龙特浦 A 等, 常常由于育性不稳定而导致自交结实, 直接影响杂交种的纯度和杂种优势的利用^[2-3]。

当前, 国内外对于细胞质雄性不育系的研究主要集中于育性的遗传及主效恢复基因方面^[4-7], 而对产生黑染花药的微效恢复基因研究较少。周天理等^[8]研究认为不育系自交结实与黑染花粉有关, 黑染花粉粒的出现又与环境和遗传互作有关, 不育基因存在一定的遗传不稳定性, 除主效恢复基因外, 还受微效恢复基因控制。雷捷成等^[9-11]在分析保持系转育 CMS-WA 的杂交 F_1 花粉育性后, 发现存在隐性的恢复基因, 进而修正为微效恢复基因, 即 r 基因, 并且表明 r 基因可能是多基因或复等位基因。游年顺等^[12]进一步研究认为微效恢复基因的表型为转育 CMS-WA 杂交 F_1 的花粉黑染特征, 同时发现转育不育系各世代的花药存在“嵌合体”, 即一朵颖花中有 1~2 个可育花药, 由此推测微效恢复基因受隐性多基因控制。富昊伟等^[13]研究指出嵌合颖花率是微效恢复基因研究中最合适的可量化指标。

为分析水稻育性微效恢复基因的遗传, 以套袋自交结实率、嵌合颖花率和黑染花粉率为指标考查不同水稻 CMS-WA 育性在多个转育高世代中的表现, 解析连续割茬后微效恢复基因导致的育性特点及自交结实后代的植株类型, 探讨了高世代不育系黑染花粉粒反复出现的原因, 为进一步研究微效恢复基因的分子遗传机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以珍汕 97A、龙特浦 A、京福 1A 等 3 个野败型不育系和相应保持系为研究材料。珍汕 97A 是杂交稻生产中应用最早、面积最大、范围最广的不育系之一, 实践证明其育性较稳定, 微效恢复基因含量较低; 龙特浦 A 具有典型的高配合力, 而在应用过程中育性容易反复, 常常出现黄色可育花粉嵌合体, 通常认为含微效恢复基因较多; 京福 1A 不育系育性因不同纬度、不同海拔、不同年份和不同季节而表现出不同程度的差异, 推测具有一定含量的微效恢复基因。3 个不育系和相应保持系材料均为低温冷库保存的高世代株系原种。

1.2 试验方法

于 2010 年晚季、2011 年早季、2011 年晚季在福州分别用珍汕 97A、龙特浦 A、京福 1A 与相应保持系连续回交繁殖 3 代高世代株系原种。各个不育系的上一世代种子仅少量用于下一世代种子的繁殖, 其余保存在低温冷库作为试验材料。

2012 年 3 个不育系的 3 个世代材料均种植在福建省农业科学院水稻研究所隔离网室, 4 月 18 日播种, 5 月 20 日移栽。田间地力、管理肥水较平衡, 设 3 次重复, 单本栽插, 每小区种植 10 行, 每行 8 株, 共 80 株, 株行距 16.7 cm × 16.7 cm。考查不育系育性表现的 3 种表现型, 分别为套袋自交结实率、嵌合颖花率和黑染花粉率。此后通过连续割茬再生 3 代, 各代同样考查其表现型。2013 年早季种植各不育系自交结实的种子, 观察其花粉育性, 记载生育期, 并对植株进行分类。

1.3 育性表型指标

套袋自交结实率是在植株的主穗抽出而尚未开花时用牛皮纸袋套袋以隔离外来花粉, 20 d 后即可考查结实率。嵌合颖花率是指嵌合颖花占全部颖花的百分比, 抽穗时将稻穗颖花的 6 个花药剥开观察其颜色, 全部为典型不育系瘦小乳白色花药的为不育颖花, 只要有 1 个黄色饱满花药即为嵌合颖花。黑染花粉率是在抽穗时取出颖花中的花药置于玻片上, 经 1% 浓度的 I_2 -IK 溶液染色, 用镊子夹碎花药, 在显微镜下观察和统计黑染花粉粒的百分率。

1.4 杂株分类

本试验的杂株均为不育系自交结实的 F_1 植株。A 型是指植株形态、生育期、花药的形态和色泽与不育系相近的植株; B 型株是指植株形态、生育期与保持系相似的植株; AB 型是指植株形态、生育期与不育系相似, 花药黄色、肥大, 不开裂或孔裂; 青棵是指植株形态高大, 迟抽穗或不抽穗的植株。

2 结果与分析

2.1 连续世代间不育系的育性表现

3 个连续高世代不育系珍汕 97A、龙特浦 A、京福 1A 的套袋自交结实率、嵌合颖花率、黑染花粉率的考查结果见表 1。珍汕 97A 连续 3 个世代的套袋自交结实率介于 0.37%~0.86%、嵌合颖花率介于 2.23%~2.52%、黑染花粉率介于 1.06%~1.19%; 龙特浦 A 各世代的套袋自交结实率介于 3.09%~4.21%、嵌合颖花率介于 8.12%~

8.92%、黑染花粉率介于 5.21%~5.49%。京福 1A 各世代的套袋自交结实率介于 1.34%~2.11%、嵌合颖花率介于 5.30%~6.75%、黑染花粉率介于 3.41%~3.61%。3 项表现型指标在 3 个材料中都表现为嵌合颖花率>黑染花粉率>套袋自交结实率。

表 1 微效恢复基因各表现型在 3 个连续高世代不育系中的表现

Table 1 Performance of phenotype of minor effect restoring gene in three high generation CMS

不育系	回交次数	套袋自交结实率/%	嵌合颖花率/%	黑染花粉率/%
珍汕 97A	1	0.86	2.42	1.19
	2	0.93	2.23	1.11
	3	0.37	2.52	1.06
龙特浦 A	1	3.45	8.92	5.49
	2	4.21	8.12	5.21
	3	3.09	8.64	5.34
京福 1A	1	2.11	6.04	3.41
	2	1.34	6.75	3.56
	3	1.83	5.30	3.61

根据表 1 统计数据推断, 若分别以各世代珍汕 97A 和龙特浦 A 的黑染花粉率进行比较:

$$5.49\% \div 1.19\% = 4.61 \approx 5; 5.21\% \div 1.11\% = 4.69 \approx 5; 5.34\% \div 1.06\% = 5.03 \approx 5$$

珍汕 97A 和京福 1A 黑染花粉率的比较结果:

$$3.41\% \div 1.19\% = 2.86 \approx 3; 3.56\% \div 1.11\% = 3.20 \approx 3; 3.61\% \div 1.06\% = 3.41 \approx 3$$

表 2 不育系、世代二因素方差分析结果

Table 2 Variance analysis of two factors (CMS and generation) of phenotype

变异来源	df	套袋自交结实率的 F 值	嵌合颖花率的 F 值	黑染花粉率的 F 值
不育系(A)	2	45.06 **	631.16 **	665.77 **
世代(C)	2	1.09	1.6	0.19
A×C	4	1.51	7.0 **	0.75

注: ** 为差异极显著 ($P < 0.01$), * 为差异显著 ($P < 0.05$), 下表同。

由此可见, 各世代珍汕 97A 与龙特浦 A 都成 1:5 的关系, 珍汕 97A 与京福 1A 都成 1:3 的关系, 即龙特浦 A 的微效恢复基因含量是珍汕 97A 的 5 倍, 京福 1A 的微效恢复基因含量是珍汕 97A

的 3 倍。假设珍汕 97A 的基因型为 (S) $f_1 f_1 f_2 f_2 r_1 r_1$, 则龙特浦 A 的基因型为 (S) $f_1 f_1 f_2 f_2 r_1 r_1 r_2 r_2 r_3 r_3 r_4 r_4 r_5 r_5$, 京福 1A 的基因型为 (S) $f_1 f_1 f_2 f_2 r_1 r_1 r_2 r_2 r_3 r_3$ 。

继续以不育系和世代二因素进行方差分析 (表 2), 珍汕 97A、龙特浦 A、京福 1A3 个材料均有不同程度的套袋自交结实率、嵌合颖花率和黑染花粉率, 差异全部达极显著水平, 而同一材料的套袋自交结实率、嵌合颖花率和黑染花粉率在各世代间均表现稳定, 没有显著差异, 由此可进一步验证 3 个不育系各含有数量不同微效恢复基因。

2.2 不育系连续割茎 3 次的育性表现

3 个高代不育系珍汕 97A、龙特浦 A、京福 1A 连续割茎 3 次的套袋自交结实率、嵌合颖花率、黑染花粉率的考查结果见表 3。

珍汕 97A 考查连续 3 次的套袋自交结实率介于 1.02%~1.94%、嵌合颖花率介于 4.52%~8.32%、黑染花粉率介于 2.31%~4.73%; 龙特浦 A 的套袋自交结实率介于 4.84%~7.33%、嵌合颖花率介于 10.20%~14.02%、黑染花粉率介于 7.85%~11.14%。京福 1A 的套袋自交结实率介于 2.16%~5.41%、嵌合颖花率介于 7.89%~9.83%、黑染花粉率介于 5.02%~7.42%。由表 3 可见, 珍汕 97A、龙特浦 A、京福 1A3 个材料套袋自交结实率、嵌合颖花率、黑染花粉率均随着割茎次数的增加而上升。

表 3 各不育系连续割茎 3 次的育性表现

Table 3 Performance of fertility in three regeneration of CMS

材料	割茎次数	套袋自交结实率/%	嵌合颖花率/%	黑染花粉率/%
珍汕 97A	1	1.02	4.52	2.31
	2	1.77	6.11	3.62
	3	1.94	8.32	4.73
龙特浦 A	1	4.84	10.20	7.85
	2	6.26	12.45	9.32
	3	7.33	14.02	11.14
京福 1A	1	2.16	7.89	5.02
	2	3.36	9.15	6.15
	3	5.41	9.83	7.42

继续以不育系和割茎再生二因素进行方差分析 (表 4), 珍汕 97A、龙特浦 A、京福 1A3 个不同材料的套袋自交结实率、嵌合颖花率和黑染花粉率的差异均达极显著水平, 而同一材料的套袋自交结实

率、嵌合颖花率和黑染花粉率在连续割茬的差异也均达极显著水平, 说明各不育系在连续割茬的胁迫下, 可以使隐含的微效基因得以表达。此外, 调查发现, 即使没有黑染花粉的单株, 割茬后又发现黑染花粉, 有黑染花粉的单株, 割茬后检查黑染花粉却消失。这一现象说明表现型是基因型和环境互作的结果, 且不育系中微效恢复基因的遗传呈不稳定性。

表 4 不育系、连续割茬二因素方差分析结果

Table 4 Variance analysis of two factors (CMS and regeneration) of phenotype

变异来源	df	套袋自交结实率的 F 值	嵌合颖花率的 F 值	黑染花粉率的 F 值
不育系(A)	2	77.12**	96.98**	196.57**
连续割茬(C)	2	18.2**	28.24**	41.36**
A×C	4	1.98	1.24	0.55

2.3 不育系自交结实的后代植株表现

由表 5 可见, 珍汕 97A、龙特浦 A、京福 1A 3 个不育系自交结实后代表现为 A 型株、B 型株、AB 型株、青株等。其中 A 型株所占的比例最大, 珍汕 97A 中 A 型株占 71.1%, 龙特浦 A 中占 43.5%, 京福 1A 中占 49.0%, 其次为 AB 型株, B 型株和青株所占比例相对较小。因而不育系微效恢复基因导致自交结实, 后代产生不同类型的杂株。

表 5 各不育系自交结实的 F_1 代植株表现Table 5 F_1 types from seeds obtained by selfing male sterile A lines

不育系	总株数	A 型株	B 型株	AB 型株	青株
珍汕 97A	45	32	6	6	1
龙特浦 A	62	27	8	18	9
京福 1A	51	25	5	16	5

3 讨 论

不育系在微效恢复基因作用下, 出现嵌合颖花和黑染花粉, 发生自交结实, 结果导致后代分离出各种类型的杂株。不同不育系的微效恢复基因含量各异, 微效恢复基因愈多, 育性愈容易波动。微效恢复基因属于数量性状遗传, 为隐性, 与遗传和环境互作有关, 野败型不育系的育性同样具有不稳定性。

复性, 采取遗传提纯等方法可以排除部分微效恢复基因, 达到提纯和去杂的目的, 若要完全将其排除, 在理论和实践上是不可能的。因而不育系繁殖过程不可避免出现黑染花粉粒和自交结实, 要求不育株率和不育度均为 100% 并不符合客观实际。

本研究检测微效恢复基因表型的指标采用套袋自交结实率、嵌合颖花率和黑染花粉率。套袋自交结实率考查最方便, 为主效恢复基因研究中应用最多的育性考查指标, 同时在一定程度上反映微效恢复基因的表现, 其缺点是自交结实率的绝对值偏小, 标准差较大。黑染花粉率符合可量化指标的要求, 但考查大样本时工作量大, 若对于群体中的全部稻穗进行颖花镜检则更加困难。以嵌合颖花率为指标, 操作简便, 经分析表明各不育系之间差异均达极显著水平, 说明嵌合颖花率可以有效区分不同类型材料微效恢复基因的表现。

参考文献:

- [1] 曾千春, 周开达, 朱祯, 等. 中国水稻杂种优势利用现状 [J]. 中国水稻科学, 2000, 14 (4): 243—246.
- [2] 朱华高. 杂交稻 AB 类杂株产生原因及不育系育性变化原因的初步研究 [J]. 作物学报, 1993, 9 (2): 139—142.
- [3] 郑秀萍, 张功宙. 龙特浦 A 杂株来源及其分析 [J]. 杂交水稻, 1998, 13 (1): 8—11.
- [4] 周天理, 沈锦骅, 叶复初. 野败型杂交籼稻的育性基因分析 [J]. 作物学报, 1983, 9 (4): 6—13.
- [5] 傅强. 野败型杂交籼稻恢复基因的遗传研究 [J]. 福建农学院学报, 1985, (3): 194—202.
- [6] 高明尉. 野败型杂交籼稻基因型的初步分析 [J]. 遗传学报, 1981, 8 (1): 66—74.
- [7] 黎垣庆. IR24 恢复基因遗传的系谱分析 [J]. 中国农业科学, 1985, (1): 24—31.
- [8] 周天理, 郑秀萍, 陈金泉, 等. 水稻不育系中杂株的来源及遗传分析 [J]. 作物学报, 1992, 18 (1): 9—16.
- [9] 雷捷成, 游年顺, 郑秀平. 野败型水稻雄性不育系保持系选育的遗传分析 [J]. 中国农业科学, 1984, (5): 30—34.
- [10] 雷捷成, 游年顺, 郑秀平. 野败水稻雄性不育系保持系选育的实践和理论 [J]. 福建省农科院学报, 1986, 1 (2): 16—21.
- [11] 雷捷成, 游年顺, 黄利兴, 等. 籼型三系不育系选育的实践和理论 [J]. 福建农业学报, 2000, 15 (S1): 136—140.
- [12] 游年顺, 黄利兴, 雷上平, 等. 水稻微效恢复基因与不育系选育研究 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25 (4): 487—492.
- [13] 富昊伟, 李友发, 马兴华, 等. “三系”不育系微效恢复基因表现型研究 [J]. 作物研究, 2010, 24 (1): 8—11.

(责任编辑: 柯文辉)