

具野稻细胞质的胞质型雄性不育系的体细胞克隆变异

II. 体细胞克隆温敏核不育突变

马镇荣 王昌虎 刘卫 凌定厚*

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 在胞质型水稻雄性不育系 IR66707A 和 IR69700A 经离体培养而获得的 136 个体细胞克隆中, 发现了温敏核不育突变 5 例。这类突变体在广州地区的自然气候下, 早季至晚季前期表现为不育, 晚季后期表现为可育。盛夏, 在幼穗发育至花粉形成阶段对部分突变材料进行短日照处理, 发现对短日照敏感的不育系农垦 58S 转换为可育, 而供试的 5 例突变及另一对照培矮 64S 却与未经处理的材料一样仍表现为不育, 表明它们的育性与日照长度的变化无关。在同一发育时期进行低温处理的结果显示, 低温处理 10 d 及 10 d 以上者可发生育性转换, 自交结实率在 17.23%-42.19% 之间, 而未经处理的材料仍然表现不育, 表明它们的育性转换与温度有关。以正常品种为父本与突变体杂交, F_1 全部为可育; F_2 可育与不育个体的分离比为 3:1; 以 F_1 为父本与之测交, TF_1 代中可育与不育个体的分离比为 1:1。遗传分析表明, 这种温敏核不育突变为一对隐性核基因所控制。获得了由胞质型雄性不育变为胞核型雄性不育的突变体, 这在体细胞克隆变异领域中是一种典型的突变。

关键词: 水稻; 体细胞克隆变异; 温敏核雄性不育

中图分类号: S511.0352 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-3395(2002)04-0313-08

Somaclonal Variation of Cytoplasmic Male Sterile Lines with Wild Rice Cytoplasm

II. Somaclonal Thermo-sensitive Genic Male Sterile Mutation

MA Zhen-rong WANG Chang-hu LIU Wei LING Ding-hou*

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Among 136 somaclones, five mutants of thermo-sensitive genic male sterile rice were obtained by somatic cell culture from two male sterile (MS) lines, IR66707A and IR69700A, which are of cytoplasmic type. The mutants were sterile during late spring until early autumn, and became fertile in late autumn (the end of October) in Guangzhou. In midsummer, when the mutants of young panicle developmental stage to pollen formation stage were used for short-day treatment (daylength was adjusted to 8 h daily for 30 days), all the mutants were still sterile,

收稿日期: 2002-01-30 接受日期: 2002-06-11

基金项目: 广东省自然科学基金 (990771); 广东省科技项目 (A2010105) 重大专项资助

* 通讯作者 Corresponding author

whereas the Nongken 58S (control) was converted to be fertile. However, when the mutants were treated under low temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$) for 10 or more days, they became fertile, the seed setting percentage being 17.23%–42.19%, whereas those under normal condition (high temperature) were still sterile. These results showed that the fertility conversion in mutants was correlated with temperature rather than with daylength. If the mutants were used as female parent to cross with normal variety, the plants in F_1 were all fertile, while in F_2 were segregated into (fertile):1 (sterile), and in testcross F_1 were in the ratio of 1 : 1. Genetical analysis indicated that the mutants were controlled by a pair recessive genes. In this experiment, we obtained a thermo-sensitive genic MS mutant that derived from cytoplasmic MS.

Key words: Rice; Somaclonal variation; Thermo-sensitive genic male sterility

在水稻杂种优势利用上,两系法不需特定的保持系,在配制杂交种子上不受恢保关系的制约^[1],特别适用于类似亚种间杂交组合的超级杂交稻的开发,具有明显的优越性^[2]。实践已经证明,两系法在杂交水稻的生产上有着广阔的前景。但是它仍存在着一些亟待解决的问题,如不育系的不育起点温度有向上漂移的现象^[3]和在低温下育性不稳定^[4]等,但最主要还是不育系种质的贫乏。据统计,目前我国 80% 以上的水稻光(温)敏不育系来源于农垦 58S^[5]。因此,发掘两系不育系的不同遗传种质而使不育系种质多样化,是一项重要课题。

我们在对胞质型不育系 IR66707A 及 IR69700A 的体细胞克隆变异的研究^[6]过程中,发现了各种类型的变异(突变)^[7],其中包括数例温敏型核不育突变。经过连续几代的观察,它们的育性是稳定的,而且具有若干独特的优点。本文报道这一研究的初步结果。

1 材料和方法

材料 胞质型不育系 IR66707A 和 IR69700A (以下分别简称为“7A”和“0A”)分别来自 *Oryza perennis* / IR64^[8]和 *Oryza glumaepatula* / IR64^[9],它们的育性只能被保持而不能被恢复。以它们为供体,经体细胞离体培养而获得的克隆及其后代为本实验的研究材料,包括:① R_1 代,即再生植株当代,以及经筛选、保留的稻莩;② R_2 代,即上一代发生育性转换的植株的种子(次年分早、晚两季播种)后代;③ 杂种及其后代,即“突变体/正常品种” F_1 及 F_2 代,“突变体//突变体/正常品种” TF_1 (以 F_1 为父本与突变体测交而来)。

离体培养方法、克隆及测交 F_1 育性的鉴别方法均见前文^[7]。

短日照处理 为了解不育材料育性转换的影响因素,在高温、长日照自然条件下,对上一年已观察到的几个发生育性转换的 R_1 及 R_2 代材料以人工遮光作短日照处理。处理的时期及方法如下:在 5 月中旬至 6 月中旬,自试验材料开始幼穗分化到抽穗前的整个幼穗发育时期,从 R_1 代中各取 1 株(稻莩), R_2 代和对照(供体、农垦 58S 及培矮 64S)中各取 5 株,移栽于田间一小区,用双层黑布夹一层红布罩在架子上进行遮光(自下午 5:00 至次日上午 9:00),每天实际光照时间为 8h,温度为自然气温(日均温度在 28°C 左右),30 d 后结束。抽穗后及时作花粉镜检,并给该穗套袋以考查其自交结实率。如出现育性转换,便认为该材料对日照长度敏感;否则为不起作用,或者说日照长度并非其育性转换的主要因素。

低温处理 对上述突变的 R_2 代同一株系的姐妹株(各 2-3 株)作低温处理。低温处理在人工气候箱里进行,温度控制在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度为 20 000 lx,每天光照时间为 14 h。处理天数分别为 3 d, 5 d, 10 d, 15 d, 30 d。开始处理的材料处于幼穗分化时期,而稍后处理的材料的幼穗发育时期则比较晚,有的主穗已经抽出。为了解低温对不同发育阶段的幼穗的影响,特别对 10 d 以上的处理进行了重复。处理完毕即把植株移栽于大田,抽穗后考查花粉及种子育性。

2 实验结果

2.1 温敏核不育突变的育性表现

由不育系 7A 及 0A 经离体培养所获得的 136 个克隆在早季全部是不育的。不育株的稻莠保留下来,至晚季 8-9 月份所抽出的稻穗仍然不育,但 10 月下旬开始,发现一些植株上有不同程度的结实。表 1 列出了 6 个克隆的 R_1 和 R_2 代以及对照(供体不育系)在早晚季自然条件下的育性表现。

表 1 体细胞克隆在不同季节的育性及育性转换表现 *
Table 1 Fertility and fertility conversion of various somaclones in different seasons*

克隆号及世代 Somaclones and generations	早季 Early rice		晚季 Late rice	
	可育花粉 Fertile pollen (%)	结实率 Seed set (%)	可育花粉 Fertile pollen (%)	结实率 Seed set (%)
1 DP7A1-1 R_1	0	1.65±0.98	42.07	26.64±8.99
2 DP7A1-1-1 R_2	0	1.60±2.47	83.52	29.83±7.82
3 7A3-2 R_1	0	0.71±0.89	52.03	43.72±5.49
4 7A3-2-1 R_2	0	0.57±0.48	89.08	52.80±12.49
5 7A8-4 R_1	0	1.33±0.71	62.56	54.85±6.08
6 7A8-4-3 R_2	0	0.93±1.77	85.62	46.84±9.94
7 0A15-1 R_1	0	1.00±0.68	64.25	36.02±8.31
8 0A15-1-1 R_2	0	3.19±2.82	82.26	49.20±9.90
9 0A16-3 R_1	0	2.11±2.14	58.96	34.43±6.24
10 0A16-3-14 R_2	0	1.43±0.96	74.88	44.35±13.94
11 7A30-2 R_1	0	0.55±0.13	0	0.70±0.35
12 7A(Control 1)	0	0.50±0.20	0	0.63±0.27
13 0A(Control 2)	0	0.48±0.16	0	0.35±0.41

* (1)7A=IR66707A, 0A=IR69700A; (2)均为自然授粉结实 Data of seed set percentage were obtained from natural pollination; (3)序号 1,3,5,7,9 和 11 的晚季材料均为 R_1 稻莠,其余为种子后代(对照为回交一代)。Materials of late rice in codes 1,3,5,7,9 and 11 were stubbles of R_1 , the rest were from seeds (controls were backcross F_1).

从表 1 可以看到,7A 及 0A(对照,序号 12 及 13)终年表现不育,其不育性不因季节、气温的变化而改变。但以它们为供体离体培养而来的克隆(序号 1-11),在早季高温长日照下表现不育,花粉不为 I-KI 所染色,它们仅有 0.57%~3.19%的自然结实率。在晚季则有两种不同的反应:一种在晚季晚期(10 月底)所抽出的穗子转换为可育,可育花粉率在 42.07%~89.08%之间,自然结实率在 26.64%~54.85%之间,说明它们的育性因季节的改变而发生变

化;另一种却仍然为不育(序号 11),与对照一样。经过连续两代的观察,结果是一致的。这表明,0A16-3 等 5 个克隆的育性因环境的变化而转换的特性是供体不育系 7A 及 0A 所不具备的,是离体培养所引起的。

2.2 影响育性转换的因素

在早季高温长日照条件下,对部分植株进行短日照处理及低温长日照处理,以了解影响上述几个克隆育性转换的因素。

短日照处理的影响 由表 2 可知,除农垦 58S (Control 3) 外,其余供试材料无论遮光短日照处理还是在自然光照条件下,其可育花粉率始终为 0,种子结实率全部在 1.59% 以下,与温敏不育系培矮 64S (Control 2) 基本一致;农垦 58S 则不同,它在自然条件下表现不育,但在短日照处理条件下,其平均可育花粉率达 48.50%,平均自交结实率达 27.14%。这表明:本试验的遮光条件对光敏不育材料是有效的;而供试材料的育性转换与日照长度的变化无关。

表 2 短日照处理对突变材料育性的影响 *
Table 2 The effect of short-day treatment on the fertility of mutants*

克隆号及世代			可育花粉	套袋自交结实率
Somaclones and generations			Fertile pollen (%)	Bagging seed set (%)
1	DP7A1-1	R ₁	0	1.59±0.80
	DP7A1-1-1	R ₂	0	0.21±0.14
2	7A8-4	R ₁	0	0.28±0.13
	7A8-4-3	R ₂	0	0.30±0.13
3	7A3-2	R ₁	0	0
	77A3-2-1	R ₂	0	0.11±0.09
4	0A 15-1	R ₁	0	0
	0A 15-1-1	R ₂	0	0.87±0.32
5	0A16-3	R ₁	0	0
	0A16-3-14	R ₂	0	0.39±0.18
Control 1	0A		0	0
Control 2	培矮 64S		0	1.72±2.47
Control 3	农垦 58S		48.50±6.56	27.14±12.06

* (1)7A=IR66707A, 0A=IR69700A (2)每个材料的 R₁ 代和 R₂ 代分别处理 1 株和 8 株,对照处理 5 株。One individual of R₁ and eight individuals of R₂ from each mutant were treated, and five individuals for each control. (3)自然条件下的可育花粉率和自交结实率均为零。No fertile pollen and seed set percentage from selfing were observed under natural condition. (4)可育花粉率为 5 月 29 日和 6 月 5 日及 15 日的镜检结果。Fertile pollen were observed by microscope on May 29, June 5 and 15.

低温处理的影响 表 3 为体细胞克隆 R₂ 代 0A16-3-14 及两个对照,各自经不同时间的低温处理之后的育性表现。从供试材料对低温的反应可以发现,适当发育时期的材料在 22±1℃ 的低温下连续处理 10 d 以上即可发生育性转换,可育花粉率为 45.00%—79.20%,自交结实率为 17.23%—42.19% (图 1)。处理时间不足(如 3 d, 5 d)或发育时期不当(如 7 月份)则不能发生这种转换。两个对照材料(0A 及培矮 64S)对低温的反应截然不同:0A 在低温条件下仍然是不育的,对低温不敏感;培矮 64S 对低温敏感,在 22±1℃ 下处理 3 d 即转为可育,

结实率为 28.30%。此外,在同一时期未经处理的突变株系都是不育的(图 2)。这说明本试验所设计的条件是有效的。

表 3 低温处理 ($22\pm 1^\circ\text{C}$)对突变材料育性的影响*

Table 3 Fertility of mutant IR69700A16-3-14 (R_2) treated under low temperature at $22\pm 1^\circ\text{C}$ *

材料 Materials	月份 Month	天数 Duration (d)	可育花粉 Fertile pollen (%)	套袋自交结实率 Bagging seed set (%)
0A16-3-14 (R_2)	June	3	0	0
	June	5	0	0
	June	10	45.00	22.76-30.92
	Jun.-Jul.	13	75.40	17.23-37.70
	Jun.-Jul.	15	79.20	20.10-42.19
	July	10	0	0
	July	20	0	0
	Jul.-Aug.	30	0	0
0A (Control 1)	Jun.-Jul.	15	0	0
64S (Control 2)	Jun.-Jul.	3	40.50	28.30

* (1) 0A=IR69700A; (2)播种期均为 3 月 7 日. Sowing date was on March 7. (3)未经处理材料的数据取自大田材料. Data of untreated materials were obtained from materials grown in the field. (4)自然条件下的可育花粉率和自交结实率均为零. No fertile pollen and seed set percentage from selfing were observed under natural condition.

从表 2 和表 3 可以认为,供试的 5 个体细胞克隆与胞质型不育系 7A 及 0A 不同,其育性可因温度的变化而改变,即在高温下表现不育,但在幼穗发育的一定时期遇到连续 10 d 以上的低温 ($22\pm 1^\circ\text{C}$) 时可由不育变为可育,而这种育性转换与日照长度无关。

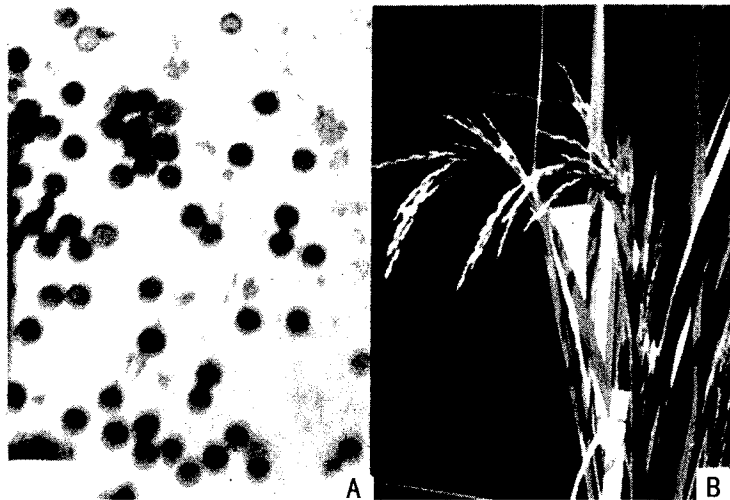


图 1 突变体 0A16-3-14 (R_2) 经低温 ($22\pm 1^\circ\text{C}$) 处理之后转换为可育,可育花粉率为 45.00%~79.20% (A), 自交结实率为 17.23%~42.19% (B)

Fig. 1 Mutant IR69700A16-3-14 (R_2) after being treated by low temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$) was converted to be fertile with 45.00%~79.20% fertile pollen (A) and 17.23%~42.19% seed setting (B)

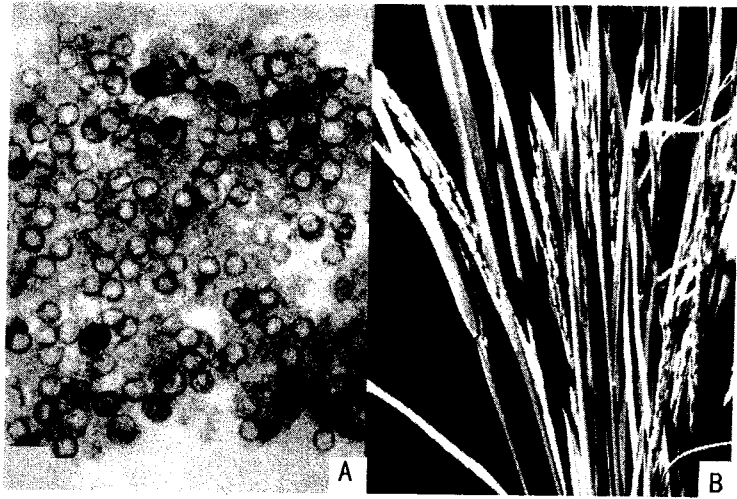


图 2 在自然高温(>28℃)、长日照条件下, 温敏核不育突变体 0A16-3-14 (R_2) 花粉不为 I-KI 所染色(A); 自交不结实(B)

Fig. 2 Sterile pollen (A) and empty grains (B) were observed in the mutant under high temperature (>28℃) and long-day condition

2.3 温敏雄性不育突变的遗传分析

表 4 为两个温敏核不育突变与广陆矮(Guanglu'ai)杂交的 F_1 和 F_2 代, 以及用 F_1 作父本与突变体测交的 TF_1 的育性表现、分离比及其 χ^2 测验的结果。由于可育基因为显性基因, F_1 群体全部表现可育, 自然结实率在 70%–88.8%之间; F_2 和 TF_1 群体中, 可育株的自然结实率均在 70%以上, 不育株的自然结实率在 0–5.97%之间(数据未列于表中)。没有“半不育”等中间类型出现。

表 4 温敏雄性不育突变杂种后代的育性分离及 χ^2 测验

Table 4 Fertility segregation of hybrid offspring from thermo-sensitive male sterile mutants and the χ^2 test

组合 Cross*	世代 Generation**	可育株数 Fertile plants	不育株数 Sterile plants	理论比例 Theoretical ratio	χ^2	P
1 0A16-3 / Guanglu'ai	F_1	40	0	1:0	0	1
2 0A16-3 / Guanglu'ai	F_2	133	47	3:1	0.1185	0.70–0.80
3 0A16-3 // 0A16-3 / Guanglu'ai	TF_1	34	30	1:1	0.2500	0.50–0.70
4 DP7A 1-1 / Guanglu'ai	F_1	56	0	1:0	0	1
5 DP7A1-1 / Guanglu'ai	F_2	151	49	3:1	0.0267	0.80–0.90
6 DP7A1-1//DP7A1-1/Guanglu'ai	TF_1	27	29	1:1	0.0714	0.70–0.80

* 7A=IR66707A, 0A=IR69700A; ** TF_1 =Testcross F_1

表 4 的结果显示, 突变体与正常品种的杂种 F_1 都是可育的, F_2 及 TF_1 (测交一代) 可育与不育的分离比分别为 3:1 及 1:1。 χ^2 测验证实, 上述分离比完全符合孟德尔一对基因的分离规律, 表明温敏雄性不育突变为一对隐性核基因所控制。

3 讨论

3.1 突变的性质

连续两个世代的观察表明,由胞质型雄性不育系 IR66707A 及 IR69700A 经离体培养而来的 5 个体细胞克隆(表 2)具有在低温条件下转换为可育的特性。这种特性是两个供体不育系所没有的,而且是稳定的和可以遗传的,因此是一种由离体培养而诱发的突变。

低温处理的结果表明,这些突变体在 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 左右的低温下需持续 10 d 及 10 d 以上才有效,供试材料才能发生育性转换(6-9 d 的效果须进一步实验),5 d 以下的处理是无效的。此外,持续的低温处理只有在幼穗分化的特定阶段(抽穗前 15-20 d 左右)才有效,超过这一阶段则无效。

陈良碧等^[10]证明,多数籼型温敏核不育系(如 G0734S, S101, G70S, G170S 等)在模拟盛夏低温 $21.9-23.5^{\circ}\text{C}$ 时持续 4 d 即发生育性转换。另据报道,盛夏低温曾使培矮 64S 在制种过程中出现不同程度的育性反复,导致育性反复的日均温为 $22.7-24.0^{\circ}\text{C}$,持续时间为 3 d^[11]。由此可见育性反复的风险在一般温敏核不育系的制种过程中普遍存在,并且这种风险产生于连续低温 4 d 以下。突变体的不育临界温度以及 6-9 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理的效果还有待于进一步鉴定。但就已取得的结果来看, $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 持续 5 d 而其育性不转换,这对于早季安全制种是十分有利的,因为在华南地区特别是广东的“盛夏低温”连续 5 d 以上的几率很小。据此可以预期,由这些突变体培育而成的不育系的育性将会更为稳定。再者,它们的供体均来自异种间的远缘杂交,具有野生种细胞质,因此这种新不育系在生产上应用,对于丰富遗传多样性具有一定的意义。

3.2 突变体的遗传特点

温敏核不育突变 0A16-3 及 DP7A1-1 的育性由隐性单基因控制,它们与正常品种杂交, F_1 群体全部可育, F_2 群体中可育与不育个体的分离比为 3:1;它们与 F_1 测交, TF_1 群体中可育与不育个体呈 1:1 的分离,表明突变体的育性为一对基因所控制(表 4)。如果将突变体与供体不育系进行比较,可发现它们在花粉败育类型上同属于孢子体不育,花粉单核后期败育,形态为典败;但突变体为胞核型雄性不育,供体不育系为胞质型雄性不育;与正常品种杂交,突变体的 F_1 只恢复不保持,供体不育系的 F_1 则只保持不恢复。

水稻光(温)敏雄性不育属于细胞核型雄性不育^[12]。本实验所获得的温敏不育突变体当属于核不育类型,而它们的供体却都是胞质型雄性不育系。换言之,通过体细胞克隆变异,将水稻的雄性不育系由胞质型变为胞核型。核质关系是控制植物雄性不育的重要机制。但目前有关雄性不育的核质关系的研究水平尚滞后于杂种优势利用的育种实践水平。本实验所获得的突变体及所采用的供体提供了研究控制雄性不育的核质关系的良好材料。运用这些材料,可以从遗传学、细胞学及分子生物学上研究雄性不育的核质关系。

参考文献:

- [1] 李泽炳. 光敏感核不育水稻育性转换机理与应用研究 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1995. 403-446.
- [2] 袁隆平. 两系法杂交水稻研究的进展 [J]. 中国农业科学, 1990, 23(3):1-6.
- [3] 袁隆平. 水稻光、温敏不育系的提纯和原种生产 [J]. 杂交水稻, 1994, (6):1-3.

- [4] 陆燕鹏, 万邦惠, 陈雄辉, 等. 两系杂交稻杂种低温下育性不稳定的初步研究 [J]. 杂交水稻, 2000, 15(6):34-36.
- [5] 朱英国. 水稻雄性不育生物学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000. 358-455.
- [6] 凌定厚, 马镇荣. 由离体培养获胞质型水稻雄性不育系的可恢复变异 [J]. 科学通报, 2000, 45(13):1400-1404.
- [7] 马镇荣, 凌定厚, 王昌虎, 等. 具野稻细胞质的胞质型雄性不育系的体细胞克隆变异 I. IR66707A 及 IR69707A 的体细胞克隆变异类型 [J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(2):152-160.
- [8] Dalmacio R D, Brar D S, Ishii T, et al. Identification and transfer of a new cytoplasmic male sterility source from *Oryza perennis* into rice (*O. sativa*) [J]. Euphytica, 1995, 82: 221-225.
- [9] Dalmacio R D, Brar D S, Virmani S S, et al. Male sterile line in rice (*Oryza sativa*) developed with *O. glumaepatula* cytoplasm [J]. IRRN, 1996, 21(1): 22-23.
- [10] 陈良碧, 周广洽, 黄亮. 湖南新选育的水稻光温敏核不育材料的育性研究 [J]. 杂交水稻, 1994, (5):23-26.
- [11] 陈良碧, 徐孟亮, 周广洽. 临界温度双低两用不育水稻的筛选研究 [J]. 杂交水稻, 1999, (4):3-4.
- [12] 李泽炳. 光敏感核不育水稻育性转换机理与应用研究 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1995. 1-38.