

水稻温敏核不育突变体 0A15-1 的 育性表现及遗传学研究

王昌虎 马镇荣 张明永 凌定厚*

(中国科学院华南植物园, 广东广州 510650)

摘要: 水稻细胞质型雄性不育系 IR69700A 的幼穗经离体培养, 获得一个体细胞克隆突变体 0A15-1。经短日照和低温处理表明, 0A15-1 具有在高温下不育和低温下转为可育的特性, 是一例温敏不育突变体。花粉染色显示 0A15-1 属于典型型不育。通过与明恢 63、优 B 和广陆矮等多个父本的杂交, 其 F₂ 和 BC₁ 群体的育性分离比都揭示 0A15-1 的不育性状受一对隐性核基因控制, 并且为孢子体型雄性不育。该新种质可以用于对相关温敏核不育基因进行分子标记及用于两系法生产杂交水稻。

关键词: 体细胞克隆突变体; 温敏核不育; 细胞质雄性不育; 水稻

中图分类号: S511.035.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395 (2004) 04-0331-06

Sterility Investigation and Genetical Analysis of a Thermosensitive Genic Male Sterile Mutant 0A15-1 in Rice

WANG Chang-hu MA Zhen-rong ZHANG Ming-yong LING Ding-hou*

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: A somaclonal mutant 0A15-1 obtained from *in vitro* culture by young panicles of IR69700A showed typically abortive type of male sterility as proved by pollen staining with 1% iodide-potassium iodide solution. As shown by short day and low temperature treatments, the mutant had a character of thermosensitive genic male sterility which exhibited fertility conversation, i.e. sterile under high temperature and fertile under low temperature, regardless of being under long day or short day. Analysis of fertility segregation pattern from F₁, F₂ and BC₁ indicated that the sterility trait of 0A15-1 was controlled by a single recessive gene and belonged to sporophytic male sterile type. This mutant is an useful material both for gene tagging and production of hybrid rice by means of photo(thermo)-sensitive male sterile lines.

Key words: Somaclonal mutant; Thermosensitive genic male sterility; Cytoplasmic male sterility; *Oryza sativa*

Dalmacio 等^[1]利用 IR64 连续回交具有 AA 基因组的野生稻 *Oryza glumaepatula* (Acc 100969) 获得了细胞质型雄性不育系 IR69700A。IR69700A 在自然条件下完全不能自交结实; 与 9 个野败型(WA) 恢复系杂交, 后代的花粉不育率高达 88%–100%, 显示这是一个与野败型不育系不同的全新不育系。从获得该不育系开始, 寻找其恢复系的工作就在各水稻生产国进行, 但是迄今仍然一无所获, 因此利

用 IR69700A 进行三系配套生产杂交水稻的工作无法开展。为进一步研究利用 IR69700A 这一特殊的种质资源, 我们通过离体培养技术获得了 IR69700A 的一系列体细胞克隆突变体。其中一类不育突变体可以被大多数籼稻品种所恢复, 包括常规的 WA 型恢复系。但是没有任何品种可以保持它的育性。这一表现与其供体 IR69700A 的表现刚好完全相反^[2]。本文选取其中具有代表性的一例体细

收稿日期: 2003-07-03 接受日期: 2003-10-10

基金项目: 广东省科技项目 (A2010105) 重大专项资助

* 通讯作者 Corresponding author

胞克隆突变体 0A15-1 作为研究对象, 以揭示其不育现象的遗传本质, 为进一步的基因标记和育种应用提供依据。

1 材料和方法

材料 不育系 IR69700A 及其保持系 IR69700B 由国际水稻研究所 Dr. Brar 提供。IR69700A 具有 *Oryza glumaepatula* 来源的细胞质^[1]。体细胞克隆突变体 0A15-1 来自于 IR69700A 的幼穗经离体培养获得的愈伤组织再生系, 离体培养及植株再生方法见马镇荣等^[2]。所有实验材料均种植于中国科学院华南植物园的水稻试验田, 不育系稻笕于冬季移栽至温室内保存。

育性标准 花粉育性通过镜检花粉在 1% I-KI 染液中的染色情况判别, 染色程序参照朱英国^[3]的方法。取刚开始开花的主穗或大分蘖穗中上部花的 3-5 个花药, 置于预先滴半滴清水的载片上, 迅速用镊子敲开花药, 使花粉散出, 加 1 滴 1% I-KI 染液均匀染色数分钟, 在显微镜下取 5 个代表性视野计数。育性按 Raj 和 Virmani^[4]的标准划分, 即花粉可育率 0 为全不育, 1%-30% 为部分不育, 30%-60% 为部分可育, 60%-100% 为可育。育性标准同时参考套袋结实率和自然结实率的数据。

低温处理 参照马镇荣等^[2]的方法作低温处理, 略做修改。在光照培养箱内进行, 温度控制采用昼夜变温的方式, 白天 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 处理 15 h, 光照强度约 $20\,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 夜晚 $16 \pm 1^\circ\text{C}$, 处理 9 h; 每日光照 15 h; 处理 10 d。早造期间, 在剑叶的叶枕和下一叶的叶枕相距为 -6 cm 时取材, 显微观察显示, 此

时为穗的颖花花粉母细胞减数分裂始期。处理完毕后即把植株移栽入大田, 抽穗后检查花粉的育性, 对转育的材料进行花粉染色率统计。

杂交组合配制 以田间花期相遇的近 50 个水稻品种作父本, 0A15-1 为母本进行杂交, 获得 F_1 ; 种植部分 F_1 种子, 获得 F_2 群体; 以 F_1 作父本, 与 0A15-1 杂交获得 BC_1 群体。所有 F_1 、 F_2 和 BC_1 材料均在早造种植, 以保证其小孢子分化处于高温和长日照的条件下。以花粉染色率和套袋结实率来鉴定 F_2 和 BC_1 的育性。

不育基因的遗传分析 F_2 群体中单株的育性分离结果。按照自花授粉植物纯合子基因型率公式来推算育性基因的对数^[5]:

$$k = (\lg n - \lg m) / \lg(1/4)$$

其中 m 为总株数、 n 为不育株数。恢复基因的遗传分析结果的适合度检验使用 χ^2 测验^[6]。

2 结果和分析

2.1 0A15-1 的花粉染色结果

不育期内 0A15-1 的花药比较细小, 呈乳白至淡黄色, 花丝细长。制片过程中 0A15-1 的花药很难敲开, 一般碎裂成大块, 而不像可育株上的花药壁极易敲开; 不育株花药散粉能力差, 镜检时部分花粉仍然不能由花药内散出, 表现出花药和花粉发育异常的特点。镜检不育期 0A15-1 花粉属于典败型雄性不育, 花粉细小而且量少 (直径约为正常可育花粉的 1/2), 一般没有内含物且表皮皱缩 (图 1A)。而可育时期的花粉为圆形且染色较深, 显示有大量的淀粉积累, 且体积也大很多 (图 1B)。

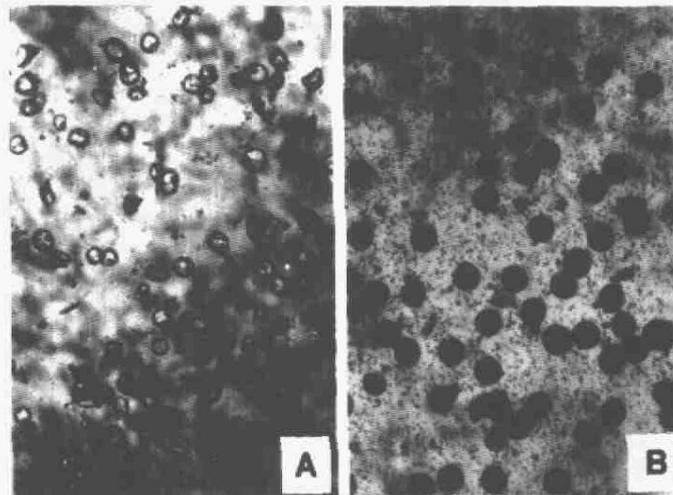


图 1 0A15-1 不育期 (A) 和可育期 (B) 的花粉 ($\times 64$)

Fig. 1 Sterile (A) and fertile (B) pollen grains ($\times 64$) of mutant 0A15-1 stained with I-KI solution

2.2 自然条件下 0A15-1 的育性变化

早造正常播种的 0A15-1 表现完全的雄性不育, 花粉染色率为 0。在晚造的前一阶段, 一般为 10 月中旬以前, 0A15-1 仍然表现完全的雄性不育 (花粉染色率为 0), 此后逐渐出现育性转换的现象, 至 10 月底染色率已经高达 81%, 表现有高比率的育性转换发生, 这一时期抽出的穗子的自交结实率达到 49.96% (表 1)。不育时期的植株株型表现为叶直立、无结实。表 1 中在花粉染色率为 0 的情况下, 包括对照在内的材料仍有较低结实率可能是串粉造成的。在晚造晚期 (10 月底), 一个植株上可以同时观察到不育穗和可育穗的存在。此现象只发生在晚造较晚时期抽的穗子上, 而且与正常植株相比结实率偏低。在 1999 至 2002 年间持续的研究显示, 0A15-1 的育性变化在不同年份间具有可重复性, 因此排除了生理不育 (不可遗传) 的可能性。结合广州地区晚造期间光温的变化规律推断, 0A15-1 的不育应该属于可遗传的环境敏感的核不育突变体, 即 EGMS (environmental genic male-sterilities)。因此, 0A15-1 的育性变化应该为受到光温条件的诱导所致, 即晚造由不育转换为可育现象为温度和 / 或光周期因素诱发的结果。

2.3 低温处理

在早造自然条件 (高温长日照) 下, 大田中的 0A15-1 仍然表现为雄性不育。经过低温长日照处理后的小穗花粉染色率达到 $76.3 \pm 2.13\%$, 表明 0A15-1 在低温长日照的条件下已经由雄性不育转换为可育, 而且控制育性转换的因素为温度, 而非日照长度。

马镇荣等^[2]的研究已经证明, 短日照处理不能引起 0A15-1 由雄性不育转换为可育。结合本文的结果, 可以将 0A15-1 的育性表现规律归纳为: 在高温条件下, 长日照或短日照下皆不育; 而在低温条件下, 长日照或短日照下皆表现为可育, 即育性转换受到温度高低的控制, 而与光周期无关。因此,

0A15-1 为一温敏不育突变体。

2.4 F₁ 的不育性状

在 1999 到 2002 年早造期间, 总共测试了 114 个杂交组合, 部分父本资料列于表 2。虽然数据为自然条件下的结实率, 不能完全排除发生串粉的可能, 但是考虑到其数据在 4 年间的可重复的特点, 可以认为串粉并不起主要作用。获得的 F₁ 群体各有 3 到 272 个个体不等, 平均约 36 个。测交 F₁ 的考种结果表明, 在 114 个被测试的父本中, 所有品种均能使 0A15-1 的育性得以恢复, 而没有一个品种能保持其不育特性。这一特点与其供体不育系 IR69700A 的表现完全相反。因此 0A15-1 象其它温敏不育系一样, 具有广泛的恢复系谱。同时也表明, 0A15-1 的不育性状受到隐性核基因的控制。无论在花粉染色率, 还是在自交结实率方面, 0A15-1 育性的恢复都表现出对父本基因型的依赖性, 比如以桂丝-8 为父本的 F₁ 结实率为近 92%, 是籼锦 B 组合的近 2 倍。不同组合 F₁ 群体中并未发现有育性分离情况, 因此 0A15-1 的不育类型为孢子体型雄性不育, 而非配子体型雄性不育。作为外植体供体的 IR69700A 的保持系 IR69700B (即 IR64) 能够部分恢复 0A15-1 的育性 (表 2), 这显示 0A15-1 与 IR69700A 不育机理的差异。

2.5 突变体 0A15-1 不育性状的遗传分析

在 3 年间 (1999-2002 年早造正常播种) 配制的 F₂ 群体总共有 44 个, 表 3 中列出其中的 30 个。从 K 值来看, 30 个组合的值都接近 1, 即 0A15-1 的不育基因为一对隐性基因所控制, χ^2 检验的结果表明这些群体中可育与不育植株数符合 3:1 的理论分离比 (置信度大于 95%)。BC₁ 的结果也进一步验证了来自 F₂ 数据的结果 (表 4), 8 个不同株系的数据与期望的 1:1 育性分离比相吻合 (置信度均大于 95%)。

表 1 0A15-1 在不同季节的育性表现
Table 1 Fertility expression of 0A15-1 in two growing seasons

材料 Material	早季 Early rice		晚季 Late rice		
	花粉染色率 Pollen staining (%)	结实率 Seed set (%)	不育阶段 Sterile stage	可育阶段 Fertile stage	
			花粉染色率 Pollen staining (%)	花粉染色率 Pollen staining (%)	结实率 Seed set (%)
0A15-1	0	1.00±0.68	0	81.00±7.37	49.75±10.22
IR169700A	0	0.48±0.16	0	0	0.35±0.41

表 2 不同组合的 F₁ 的育性调查结果
Table 2 Results of fertility restored by different pollen parents in F₁ generation

父本 * Pollen parents	F ₁ 群体 F ₁ size	花粉染色率 Pollen staining (%)	结实率 ** Seed set (%)
桂丝 -8 (Guisi-8)	272	-	91.99±2.02
南胜(Nansheng)	47	-	90.38±1.45
IR57301-19-1	56	-	89.17±5.15
H11	27	-	87.00±2.54
密粘 4 号(Mizhan4)	11	-	86.82±3.02
粤马粘(Yuemazhan)	23	-	86.82±3.10
粤青粘(Yueqingzhan)	21	-	83.83±2.28
茉莉粘(Molizhan)	15	-	83.75±3.10
IR31829	20	-	83.10±3.03
双二粘(Shuang'erzhan)	12	-	82.87±3.97
博 B (Bo B)	248	-	80.38±3.65
测 222 (Ce 222)	40	-	78.44±3.26
轮回 422 (Lunhui 422)	8	-	69.94±3.79
IR69700B	48	-	66.72±2.54
甯锦 B (Shijing B)	69	-	52.68±3.64
明恢 63 (Minghui 63)	26	100.00±0.00	-
广陆矮 (Guangluai)	52	100.00±0.00	-
J 亿 5505 (J Yi5505)	17	100.00±0.00	-
包源 B (Baoyuan B)	23	100.00±0.00	-
珍 B (Zhen B)	12	100.00±0.00	-
广 1 (Guang 1)	11	100.00±0.00	-
屯山粘(Tunshanzhan)	24	100.00±0.00	-
3550	12	100.00±0.00	-
G0741	6	100.00±0.00	-
五山粘 3 号 (Wushanzhan 3)	18	100.00±0.00	-
红源 B (Hongyuan B)	12	99.67±0.58	-
968 (广西) (968 Guangxi)	6	99.67±0.58	-
优 1B (You 1B)	12	99.00±1.00	-
优 B (You B)	28	94.67±2.08	-
华早 3 号(Huazao 3)	18	91.67±7.64	-

* 除表中列出部分外, 父本还包括内选 4 号、城特 232、野珍 B、39327、珍新粘 2 号、胜桂 2、万夫香、巴太粘、白油粘、培 312、青油粘、特三矮、特青、晚 3、五香丝苗、新世纪软粘和 IR26 等。 **2000 年晚造数据, 每组合取 5 株, 每株取 5 穗考种统计结实率。 *Besides those listed in table, pollen parents also include: Neixuan4, Chengte232, Yezhen B, 39327, Zhenxinzhan 2, Shenggui2, Wanfuxiang, Bataizhan, Baiyouzhan, Pei312, Qingyouzhan, Tesan'ai, Teqing, Wan3, Wuxiangsimiao, Xinshijiruanzhan, and IR26. **Data were obtained from late rice in 2000. Seed set percentage was determined by counting 5 panicles per plant, and 5 plants per cross were used. “-” 无数据 No data.

3 讨论

通过对育性表现和转换的研究, 结合各 F₂ 和 BC₁ 分离群体的结果可以得出, 0A15-1 为一隐性温敏核不育突变体。其不育性状受到一对隐性核基因

的控制, 花粉败育表现为典败型。这与许多水稻温敏不育系的情况一致, 如 5460S^[7]、安农 S-1 和 26 窄早 S^[8]等, 以及日本的 Norin PL12^[9]、IRRI 的 IR32364TGMS、韩国的 95841ms 和 95850ms^[10]等。而且与已经研究的光(温)敏核不育系水稻相同, 0A15-1 具有广泛的恢复系谱, 有应用于“两系”杂交水稻生产的潜力。根据表 2 不同父本制作的 F₁ 群体显示, 它们恢复能力有差异, 这为利用该不育系进行两系杂交水稻生产选择父本提供了一定的依据。

与外植体供体材料 IR69700A 表现为细胞质型雄性不育(CMS)不同, 0A15-1 的不育为隐性温敏核不育。一方面, IR69700A 属于细胞质雄性不育系, 其不育性通过保持系 IR69700B 来保持, 而 0A15-1 的育性却可以被 IR69700B 部分恢复。另外, 0A15-1 在自然条件下表现的育性转换在其供体材料 IR69700A 中也不存在。可见, 0A15-1 的不育特性与 IR69700A 在本质上是完全不同的, 因此二者的不育基因不可能是等位的, 应该涉及不同的基因位点。在不育花粉的染色方面, 0A15-1 表现与 IR69700A 类似, 都为典败, 又表现出二者相似的一面。梅明华和李泽炳^[11]研究发现温敏不育系 W6154S 能部分恢复 7 个籼型细胞质雄性不育系的育性, 因此初步推断温敏不育基因与细胞质雄性不育基因是独立发生的。结合我们的研究结果可以看出, 尽管温敏核不育与细胞质雄性不育都表现为水稻花粉的功能散失, 但是引起雄性不育的机理是不同的。经过离体培养由 CMS 获得了 TGMS (温敏核不育系), 发生这种转变的分子机理到底是什么, 尚须进一步的实验研究。可能的原因包括, 在组织培养过程中产生细胞质雄性不育回复突变, 并同时产生温敏核不育基因的突变; 或者在组织培养过程中发生温敏核不育基因的突变, 但是该突变可以通过基因相互作用而使细胞质雄性不育得以回复等等。

本项研究虽然证明 0A15-1 为一温敏核不育突变体, 但在将其应用于生产之前, 还需确定起点温度和对其光温反应特性做系统的分析。

0A15-1 的不育性状受到一对隐性核不育基因的控制, 因此可以用于不育基因的定位工作。由于 0A15-1 特殊的系谱组成, 其温敏核不育基因很有可能与已经发表的基因不同, 对该不育基因进行定位很有可能发现新的水稻温敏核不育基因。同时, 找到与该温敏核不育基因连锁的分子标记, 也可以为分子育种提供有效的工具。

表 3 F₂ (0A15-1 × 恢复系) 育性分离的遗传统计分析
Table 3 Genetic analysis of fertility segregation in F₂ (0A15-1 cross restorer lines)

父本 Pollen parents	株数 No. of individuals		K 值 K value	总株数 Total individuals	x ² * (3:1)
	可育株 Fertile	不育株 Sterile			
桂丝-8 (Guisi-8)	300	100	1.00	400	0.0033
968	59	21	0.96	80	0.0167
G0724	60	20	1.00	80	0.0167
R11	54	26	0.81	80	2.0167
39317	66	14	1.26	80	2.0167
珍新粘 2 号 (Zhenxinzhan2)	55	25	0.84	80	1.3500
内选 4 号 (Neixuan4)	63	17	1.12	80	0.4167
优 B (You B)	63	17	1.12	80	0.4167
城特 232 (Chengte232)	57	23	0.90	80	0.4167
IR69700B	235	70	1.06	305	0.5781
轮回 422 (Lunhui422)	198	67	0.99	265	0.0013
筐锦 B (Shijing B)	213	59	1.10	272	1.4167
G35	195	61	1.03	256	0.1302
G70	190	74	0.92	264	1.1364
G77	199	57	1.08	256	0.8802
优 1B (You 1B)	92	28	1.05	120	0.1000
红源 B (Hongyuan B)	57	23	0.90	80	0.4167
包源 B (Baoyuan B)	61	19	1.04	80	0.0167
珍 B (Zhen B)	63	17	1.12	80	0.4167
野珍 B (Yezhen B)	94	26	1.10	120	0.5444
广陆矮 (Guangluai)	89	31	0.98	120	0.0111
胜桂 2 (Shenggui2)	62	18	1.08	80	0.1500
南胜 (Nansheng)	61	19	1.04	80	0.0167
明恢 63 (Minghui63)	87	33	0.93	120	0.2778
万夫香 (Wanfuxiang)	60	20	1.00	80	0.0167
广 1 (Guang 1)	59	21	0.96	80	0.0167
屯山粘 (Tunshanzhan)	62	18	1.08	80	0.1500
3550	64	16	1.16	80	0.8167
99C96	32	8	1.16	40	0.3000
G56	180	60	1.00	240	0.0056

*x²_{1, 0.05}=3.841

表 4 BC₁ [(0A15-1 × (0A15-1 × Guisi-8))] 的育性分离统计结果
Table 4 Statistical result of fertility segregation pattern in BC₁ population (0A15-1 × (0A15-1 × Guisi-8))

株系号 Line No.	不育株数 Sterile individuals	可育株数 Fertile individuals	总株数 Total individuals	x ² * (1:1)
1	9	5	14	0.6429
2	18	12	30	0.8333
3	6	5	11	0.0000
4	10	12	22	0.0455
5	17	14	31	0.1290
6	14	15	29	0.0000
7	12	12	24	0.0417
8	29	27	56	0.0179
总数 Total	115	102	217	0.6636

*x²_{1, 0.05}=3.841

参考文献

- [1] 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.
- [2] Ma Z R (马镇荣), Wang C H (王昌虎), Liu W (刘卫), et al. Somaclonal variation of cytoplasmic male sterile lines with wild rice cytoplasm II. Somaclonal thermo-sensitive genic male sterile mutation [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2002, 10(4): 313-320. (in Chinese)
- [3] Zhu Y G (朱英国). Biology of Male Sterility in Rice [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2000. 104-105. (in Chinese)
- [4] Raj K G, Virmani S S. Genetics of fertility restoration of 'WA' type cytoplasmic male sterility in rice [J]. Crop Sci, 1988, 28:787-792.
- [5] Qing T C (秦泰辰). Male Sterile Breeding in Crops [M]. Beijing: Higher Education Press, 1993. 176. (in Chinese)
- [6] Du R Q (杜荣寿). Biostatistics [M]. Beijing: Higher Education Press, 1985. 147-151. (in Chinese)
- [7] Sun Z X, Min S K, Xiong Z M. A temperature-sensitive male-sterile line found in rice [J]. Rice Gen News, 1989, 6: 6-117.
- [8] Shen Y W, Kai Q H, Gao M W. A new thermosensitive radiation-induced male-sterile rice [J]. Rice Gen News, 1993, 10: 97.
- [9] Maruyama K, Araki H, Kato H. Thermosensitive genetic male sterility induced by irradiation [A]. In: Rice Genetics. II [M]. Manila, Philippines: IRRI Press, 1991. 227-232.
- [10] Ku S J, Cho K H, Choi Y J, et al. Cytological observation of two environmental genic male-sterile lines of rice [J]. Mol Cells, 2001, 12(3):403-406.
- [11] Mei M H (梅明华), Li Z B (李泽炳). Analysis of genetic relationships between PGMS(TGMS) lines and CMS lines in rice [J]. Hereditas (遗传), 1995, 17(1): 22-25. (in Chinese)