



应用微效恢复基因与播期互作效应分析水稻CMS的育性敏感性

林强^{1,2†}, 蔡秋华^{1,2†}, 王颖姮^{1,2}, 崔丽丽^{1,2}, 陈丽萍^{1,2}, 蒋家煊^{1,2}, 肖晏嘉^{1,2}, 张建福^{1,2*}

1. 福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350019;

2. 农业农村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/杂交水稻国家重点实验室华南研究基地/水稻国家工程实验室, 福州 350003

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: jianfzhang@163.com

2024-04-12 收稿, 2024-07-02 修回, 2024-10-16 接受, 2024-10-24 网络版发表

福建省自然科学基金(2021J01474)、福建省属公益类科研专项(2021RR1023006)、福建省科技重大专项(2022NZ030014)、福建省人民政府-中国农业科学院协同创新工程(XTCXGC2021019)和福建省财政专项-福建省农业科学院科技创新团队(CXTD2021005-3)资助

摘要 烟后制种指烟叶收获后的农田进行杂交水稻制种或不育系繁殖, 是南方制种区域产业结构调整的耕作制度新模式. 本试验在烟后制种期, 研究分析水稻细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)微效恢复基因与播期互作对不育性稳定性的影响, 为不育系繁殖提纯、遗传选育和烟后制种提供理论参考与实际应用依据. 选择5个不同微效恢复基因数量的不育系珍汕97A、龙特浦A、野香A、京福1A、301A, 设置4个播期和2个试点, 在播期、地点及其互作下, 以嵌合颖花率和黑染花粉率为花粉育性指标进行解析比较, 应用主效可加互作可乘模型(additive main effects and multiplicative interaction model, AMMI模型)分析, 探究不育系花粉育性的动态趋势. CMS的育性回复除受主效基因控制外, 微效基因也产生累加作用. 龙特浦A属于微效恢复基因数量较多类型, 对播期和试点变化反应较为敏感; 野香A、京福1A、301A归类为微效恢复基因数量中间类型, 对播期等因素有一定程度的反应; 珍汕97A为微效恢复基因数量较少类型, 对播期等因素反应敏感度低. 对播期敏感度效应从大到小依次为龙特浦A、301A、京福1A、野香A、珍汕97A. 根据CMS不育性的敏感性效应, 在生产上进行烟后制种和繁殖时, 播期适当提前对于种子纯化效果较好, 在不育系遗传选育和原种提纯时, 选择微效恢复基因高效表达的时期进行, 有利于及早剔除不合格单株, 加快获得不育性稳定的群体.

关键词 水稻, 细胞质雄性不育(CMS), 花粉育性, 微效恢复基因

1966年袁隆平《水稻的雄性不孕性》一文的发表^[1], 开启了我国水稻杂种优势利用技术研发的序幕, 杂交水稻单位面积产量在常规矮秆优良品种的基础上提高20%左右, 为水稻生产带来了突破性飞跃. 细胞质雄性不育系是三系杂交稻的基础, 繁殖和配制杂交种都为异花传粉, 如果不育系中可育株去杂不完全, 将会

影响其及杂种的纯度. 据研究, 利用不育系制种时混杂率每增加1%, 杂交稻的产量损失可达 100 kg hm^{-2} , 当混杂率达到4%, 产量优势则全部消失^[2]. 因此确保不育系的纯度是杂交稻制种生产的关键之一. 不育系中的杂株类型多样, 来源复杂, 与繁殖时人为去杂防杂措施及内外因素的干扰有关. 周天理等人^[3]对不育系中的杂株

引用格式: 林强, 蔡秋华, 王颖姮, 等. 应用微效恢复基因与播期互作效应分析水稻CMS的育性敏感性. 科学通报, 2024, 69: 5173–5182

Lin Q, Cai Q H, Wang Y H, et al. Analysis of interaction between minor-effect restoring gene and sowing date reveals the fertility sensitivity to CMS lines in indica rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 5173–5182, doi: [10.1360/TB-2024-0393](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0393)

进行农艺形态调查、花粉育性鉴定和杂交遗传分析,发现不育系的花粉育性波动与环境因素及不育基因遗传不稳定性有关.可见,开展CMS不育性遗传稳定性的研究,对水稻杂种优势利用具有重要的理论参考与实际应用价值.

当前推广应用的籼型细胞质雄性不育系均由我国农业科技工作者自主创新选育而成,包括野败、矮败、印水、冈、D、K、马协、红莲等各种类型,其中野败型不育系是最早得以利用的质核互作花粉败育类型,配制的杂交稻品种长期在生产中占据重要位置^[4].矮败、印水、冈、D、K、马协型等质源不育系,花粉败育类型与野败型一样皆为孢子体不育,且恢保关系相近或相同,多数研究认为它们属于同一遗传类型^[5-8].Luan等人^[9]通过对雄性不育系的细胞质mtDNA位点序列对比分析,指出印水、D、K、冈、矮败等类型细胞质均与野败型来源相同.Luo等人^[10]利用野败型不育系克隆获得核质互作不育关键基因WA352,并发现冈、印水、矮败等类型不育系同样含有该基因,认为它们属于同一胞质类型.高世代的细胞质雄性不育系花粉育性的回复和波动,同样会出现黑染花粉粒、颖花嵌合体甚至自交结实粒的现象,这与环境和遗传紧密相关^[3].雷捷成等人^[11]从选育保持系入手,认为微效恢复基因的存在会干扰F₁花粉育性.而后游年顺等人^[12]分析认为,不育系微效恢复基因为隐性多基因.不同不育系在自然温度条件下花粉不育稳定性表现差异^[13].不育系龙特浦A从苞分化期至花粉完成期,外界温度处于25~28.5℃范围,黑染花粉粒增多,外界温度低于25℃或高于28.5℃时,花粉黑染粒减少^[14,15].但也有研究指出,不育系龙特浦A在抽穗前15 d,日均温与黑染花药率呈正相关,当温度在26~29℃时,花粉黑染率则较低^[16].光照长度这一环境因素对CMS不育性也有影响,光照长度减少,花粉不育性容易回复^[17].但另有研究表明,光周期对不育系龙特浦A花粉的败育程度没有影响^[18].可见,温度、光长等外界条件对CMS不育性影响的研究颇多,而类似两系不育系育性发生变化的光温临界点和敏感期并不一致.

本团队初步研究认为,基因型差异是影响CMS不育性的首要因素,播栽温度效应明显,不育系微效恢复基因数量越少,对播栽温度的敏感度越低^[19],温光互作对CMS微效恢复基因的表达也有影响,对于温光并进型CMS,光照长度作用尤为显著,与播栽温度存在互促效应,最终影响花粉育性的表现,而温度敏感型CMS略

为不同,光照长度作用不如前者明显,但可与播栽温度形成互作关系影响花粉育性^[20].本试验为探析水稻CMS的育性敏感性,以不同微效恢复基因数量的不育系为材料,在播期、地点及其互作下,研究CMS花粉育性波动的动态变化趋势,可为细胞质雄性不育系的遗传选育与亲本提纯、烟后繁殖与杂交制种提供理论支撑和应用参考.

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用典型代表性籼型细胞质雄性不育系5个:珍汕97A、龙特浦A、野香A,其他2个不育系为本研究团队育成,包括京福1A、301A.上述材料应用遗传提纯法,通过连续割茬和花粉镜检,筛选出纯合一致的单株,从而获得不育度高且稳定的群体^[21].

1.2 试验方法

2012年在福建省农业科学院水稻研究所福州连坂育种基地(东经119°21',北纬26°00',海拔17 m)将珍汕97A、龙特浦A、京福1A等3个不育系分别种植100株,连续回交3代,每回交一代均考查不育系的花粉育性表现,研究不育系育性指标黑染花粉率、嵌合颖花率与套袋自交结实率的相互关系.为了分析微效恢复基因与播期互作效应,2021年在福州连坂育种基地和福建省三明市沙县夏茂水稻新品种选育基地(东经117°39',北纬26°34',海拔183 m)自然温光条件下进行,珍汕97A、龙特浦A、野香A、京福1A、301A共5个不育系在2个试验点分4期播种,每个不育系每小区种植100株,设置3个重复.第1期从5月15日开始,每期间隔15 d,播期依次以I、II、III、IV表示,秧龄30 d,单本栽插,采取常规方式管理试验田块,抽穗时进行花粉育性检测.同年在福州将珍汕97A、龙特浦A、野香A、京福1A、301A不育系种植于隔离网室中,每个不育系种植100株,抽穗时调查农艺性状和花药特征,识别和筛选出株叶形态特征、生育期、花药大小和颜色与其不育系相近的植株(即A型株^[3]或育性回复株^[22]),对A型株套上牛皮纸袋让其自交,并分别与其相应的保持系杂交,至成熟时收获(A型×B)F₁和自交结实种子.次年分别种植5个不育系、自交结实种子及(A型×B)F₁各100株,于抽穗时进行花粉育性检测和统计.

1.3 花粉育性检测

黑染花粉率镜检方法: 不育系抽穗时从群体中随机取样5株, 每株选取1个稻穗用镊子在其上、中、下3处夹取颖花3朵, 取其全部花药18颗, 放置于事先滴有1%浓度I₂-KI溶液0.1 mL的玻璃载玻片上, 摄碎混匀并染色后用4×10倍生物显微镜观察, 每张玻璃载玻片选择3个具代表性视野, 一个视野检视50粒花粉, 每小区不育系约检视750粒花粉, 按败育和黑染花粉粒分2种类型计算, 黑染花粉粒占全部花粉粒的百分比为黑染花粉粒率。

嵌合颖花率考查方法: 不育系抽穗时从群体中随机取样5株, 选取当天将开未开的颖花穗粒, 剥开颖壳, 观察花药形态特征, 不育颖花为瘦小型水渍状, 而嵌合体含有黄色饱满型花药, 每小区不育系约检视200朵颖花, 嵌合体占全部颖花的百分比为嵌合颖花率。

1.4 统计分析

对2021年不育系分期播种试验获得的黑染花粉率和嵌合颖花率数据分别采用DSP软件进行方差、回归模型和AMMI模型分析。根据陶华和薛庆中^[23]的方法, AMMI模型公式为:

$$y_{mno} = \mu + \alpha_m + \beta_n + \sum_{s=1}^p \lambda_s \gamma_{ms} \delta_{ns} + \rho_{mn} + \varepsilon_{mno},$$

$m=1, 2, \dots, I; n=1, 2, \dots, J; o=1, 2, \dots, K$; 公式中, y_{mno} 表示在 m 播期下 n 基因型的 o 次重复的检测值, μ 是检测值的总平均, α_m 和 β_n 分别是基因型和播期的效应值, λ_s 表示第 s 个交互效应成分轴(interaction principal component axis, IPCA)的特征根, γ_{ms} 表示第 s 个主成分的基因型 m 的特征向量值, δ_{ns} 表示第 s 个主成分的播期 n 的特征向量值, p 指保留在模型中的IPCA轴, ρ_{mn} 为提取 p 个IPCA轴后留下的残差, ε_{mno} 为试验误差。稳定性参数(Dm)是在微效恢复基因影响下主效基因在IPCA空间

中距离原点数值, 计算公式为

$$Dm = \sqrt{\sum_{s=1}^c \gamma_{ms}^2},$$

其中, c 为显著的IPCA数量, γ_{ms} 指主效基因 m 在第 s 个IPCA上的分值。

2 结果与分析

2.1 不育系育性基因分析

据5个不育系珍汕97A、龙特浦A、野香A、京福1A、301A黑染花粉形态的比较观察(图1), 珍汕97A花粉粒I₂-IK溶液染色后, 主要为典败, 少量圆败, 颖花多数呈典型乳白色瘦小水渍状, 少量夹杂有嵌合体; 龙特浦A花粉粒主要为典败、圆败和染败, 间有黑染花粉粒, 颖花有小部分花药呈黄色未开裂状, 嵌合颖花夹杂其中; 野香A、京福1A、301A嵌合颖花数量介于珍汕97A与龙特浦A之间, 染色后花粉粒多为典败和圆败, 伴有零星黑染花粉粒出现。

对不育系A群体、A型株群体与(A型×B)_{F1}群体的花粉育性进行比较(表1), 珍汕97A、龙特浦A、野香A、京福1A、301A不育系与其相应A型、(A型×B)_{F1}黑染花粉率检测结果表明, 三者之间差异均不显著。根据已有研究结果报道^[24,25], 不育系育性的主效基因型为S(r₁r₁r₂r₂), 说明A型和(A型×B)_{F1}的育性主效基因型同为S(r₁r₁r₂r₂)。

进一步分析花粉育性数据, 将珍汕97A不育系、A型、(A型×B)_{F1}各群体黑染花粉率分别和龙特浦A对应的群体进行比较: $11.51 \div 2.76 = 4.17$, $11.19 \div 2.53 = 4.42$, $11.94 \div 3.25 = 3.67$, 比值结果介于3.67~4.42之间; 将珍汕97A相关各群体黑染花粉率分别与京福1A对应的群体进行比较: $8.4 \div 2.76 = 3.04$, $8.14 \div 2.53 = 3.22$, $8.59 \div 3.25 = 2.64$, 比值结果介于2.64~3.22之间; 同样将

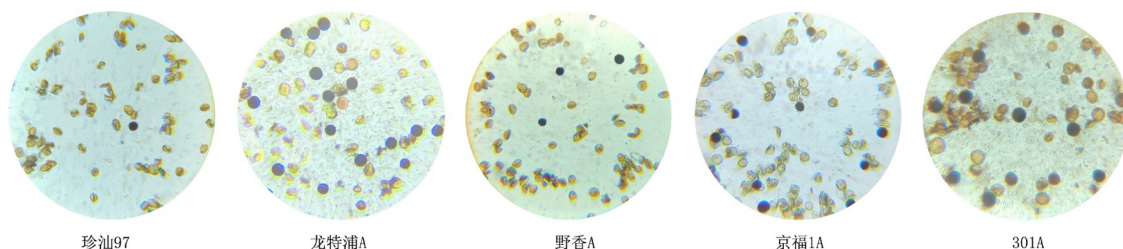


图1 (网络版彩色) 5个细胞质雄性不育系黑染花粉粒比较
Figure 1 (Color online) Comparison of dark pollen by I₂-IK dyed in 5 CMS lines

表 1 不育系植株与A型株及(A型×B)_{F1}株花粉不育性比较^{a)}

Table 1 Comparison pollen sterility of CMS line that of B type and (A type B)_{F1}

不育系	群体		A型		(A型×B) _{F1}	
	总株数	黑染花粉率(%)	总株数	黑染花粉率(%)	总株数	黑染花粉率(%)
珍汕97A	100	2.76±1.33a	10	2.53±0.40a	21	2.35±0.98a
龙特浦A	100	11.51±1.18a	15	11.19±1.41a	35	11.94±0.94a
野香A	100	8.40±0.97a	23	8.14±0.42a	28	8.59±0.91a
京福1A	100	8.76±0.57a	16	8.90±1.06a	24	8.28±0.83a
301A	100	8.94±1.49a	12	9.15±0.67a	27	8.49±0.35a

a) 平均值±标准误差, 同列后跟相同字母表示差异未达0.05显著水平(最小显著差法)

珍汕97A相关各群体黑染花粉率分别和野香A对应的群体进行比较: $8.76 \div 2.76 = 3.17$, $8.9 \div 2.53 = 3.52$, $8.28 \div 2.35 = 2.55$, 比值结果介于2.55~3.52之间; 将珍汕97A相关各群体黑染花粉率分别和301A对应的群体进行比较: $8.94 \div 2.76 = 3.24$, $9.15 \div 2.53 = 3.62$, $8.49 \div 2.35 = 2.61$, 比值结果介于2.61~3.62之间. 上述结果可见, 珍汕97A不育系、A型、(A型×B)_{F1}各群体黑染花粉率和京福1A、野香A、301A相关各群体比例均接近1:3的关系, 即京福1A、野香A、301A的微效恢复基因数量是珍汕97的3倍, 而龙特浦A相关各群体比例是珍汕97的4或4倍以上. 实践证明, 珍汕97不育性稳定, 设其微效恢复基因为1对, 京福1A、野香A、301A则为3对, 龙特浦A为4对或4对以上, 该结果与雷捷成和笔者之前的研究结果相一致^[11,26].

2.2 微效恢复基因数量与不育系自交结实的关系

黑染花粉率、嵌合颖花率和套袋自交结实率均为检测不育系花粉育性的常用指标, 应用这3个指标对珍汕97A、龙特浦A、京福1A不育系3个连续回交世代的花粉育性数据进行相关分析, 套袋自交结实率和黑染花粉率相关系数为0.89, 套袋自交结实率和嵌合颖花率相关系数为0.92, 黑染花粉率和嵌合颖花率相关系数为0.99, 三者之间均为极显著正相关关系(图2), 说明这3个育性指标均可准确反映花粉败育程度, 符合育性表型鉴定可量化的要求, 且关联性强, 具可替代性. 根据连续回交世代的花粉育性指标数据, 以 X_1 代表黑染花粉率, Y 表示套袋自交结实率, 两者呈幂函数关系: $Y = 1.86X_1^{0.824}$, 同样以 X_2 表示嵌合颖花率, 计算获得其与套袋自交结实率的幂函数关系式: $Y = 3.67X_2^{0.646}$. 通过这2个关系式可以看出, 随着黑染花粉率和嵌合颖花

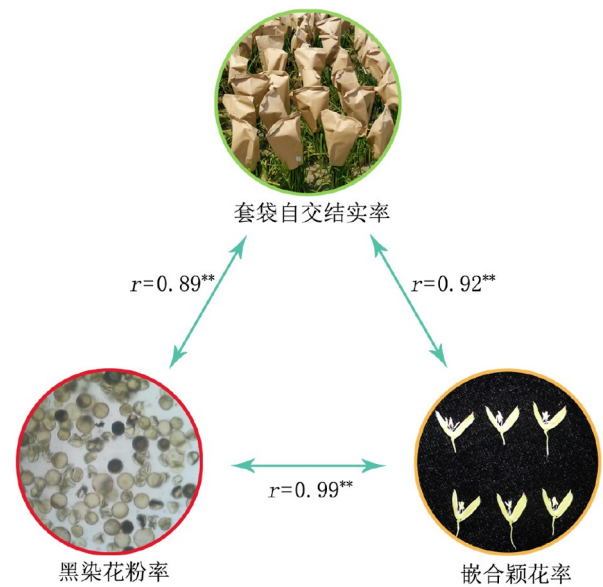


图 2 (网络版彩色)套袋自交结实率、嵌合颖花率和黑染花粉率相关关系

Figure 2 (Color online) The correlation among bagged seed setting rate, dark pollen rate by I₂-IK dyed and rate of florets with fertile anthers

率的上升, 黑染花粉粒和嵌合颖花数量相应增多, 花粉萌发活力和受精能力得以提高, 套袋自交结实率随之上升.

对5个基因型的黑染花粉率和嵌合颖花率2个关键育性指标, 利用欧氏距离法进行聚类分析(图3), 这2个育性指标聚类结果基本相同, 可将5个不同的基因型分为3类, 野香A(3)、京福1A(4)和301A(5)为第1类, 龙特浦A(2)为第2类, 珍汕97A(1)为第3类. 第3类不育系珍汕97不育性稳定, 微效恢复基因为1对, 第2类不育系龙特浦A不育性容易波动, 微效恢复基因为4对或4对以上, 第1类不育系京福1A、野香A、301A不育性稳定性介于第1类和第3类之间, 微效恢复基因为3对. 不育系微

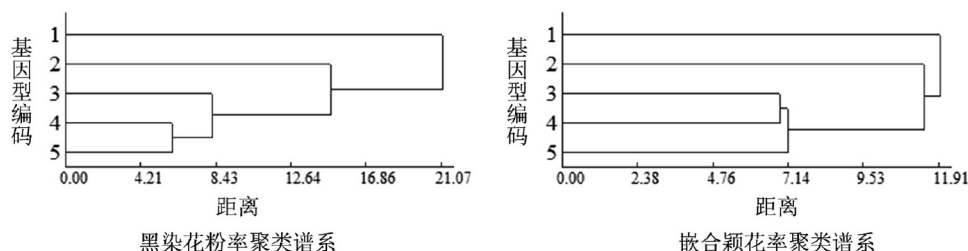


图3 5种基因型黑染花粉率和嵌合颖花率聚类谱系图

Figure 3 Dendrogram of 5 genotypes clustered according to dark pollen rate by I_2 -IK dyed and rate of florets with fertile anthers

效恢复基因数量越多,产生的黑染花粉粒和嵌合颖花也越多,从而造成自交结实率提高,从黑染花粉率、嵌合颖花率与套袋自交结实率的幂函数关系式可计算获得不育系自交结实产生的混杂率。

2.3 不同基因型细胞质雄性不育系育性的敏感性

通过AMMI模型分析,可以反映每个不育系在各播期下花粉育性的动态趋势,并揭示基因型与播期之间复杂互作的特性^[23]。该模型针对福州和沙县试验点的分析显示,基因型、播期对不育系花粉育性产生极显著的效应(表2)。在福州试验点的黑染花粉率和嵌合颖花率这2个育性指标基因型变异平方和(sum of squares, SS)分别占总变异SS的47.00%和47.43%,播期分别占总SS的33.43%和22.31%,说明基因型差异是最主要的,播期具有明显效应。沙县试验点黑染花粉率和嵌合颖花率基因型变异平方和分别占总SS的55.58%和46.25%,播期分别占总SS的29.76%和25.22%,同样表明基因型差异是最主要的,播期效应颇为明显。福州和沙县2个试验点数据显示,2个关键育性指标与播期之间的互作效应,其互作项IPCA1的均方(mean square, MS)均表现极显著,而且两者IPCA1的变异平方和对交互作用的贡献比例较高,范围介于72.91%~84.60%之间,IPCA2的变异平方和占交互作用的区间为11.87%~23.62%。

用黑染花粉率和嵌合颖花率两者作为衡量不育系花粉育性的关键指标,将这2个指标平均值及对应的基因型和播期在交互效应主成分轴IPCA1、IPCA2上的分值列于表3,基因型主效应值能够清晰显示花粉不育性的稳定性,福州和沙县2个试验点可以看出,珍汕97A黑染花粉率、嵌合颖花率的平均值均在较低水平,表明该不育系花粉不育性相对稳定,黑染花粉率变幅为1.738%~2.176%,而嵌合颖花率变幅为0.410%~0.636%;龙特浦A的2个育性指标平均值数值较高,变幅分别为

8.420%~9.287%、4.594%~5.336%,育性波动大;野香A、京福1A、301A育性指标平均值均介于珍汕97A和龙特浦A之间,变幅分别5.462%~6.668%、2.589%~4.103%。福州和沙县试验点在4个播期内花粉育性主效应值均依次为: I > II > III > IV,反映出不育系随着播期推迟,花粉不育性愈不稳定。

2.4 AMMI模型互作效应分析

基因型IPCA数值显著程度可以显示不育系的播期敏感性,不育系珍汕97A在福州、沙县试验点黑染花粉率IPCA1数值分别为-1.437和-1.308,嵌合颖花率的IPCA1数值分别为-0.999和-0.960,分值低且均为负数,显示出该不育系花粉育性对播期的敏感性较低;而不育系龙特浦A、京福1A和301A的花粉育性指标IPCA1多数呈现正值且分值偏高,明确表明它们对播期的高度敏感性;2个试验点野香A的黑染花粉率和嵌合颖花率的基因型IPCA1分别为0.027、-0.848和0.196、-0.855,分值较低,显示其对播期的敏感反应也较为有限。播期IPCA互作的分值可以显示不同播期条件下环境因素对不育系花粉育性的具体影响程度,播期IPCA值愈大,不育性的稳定性愈差。福州和沙县试验点的4个播期IPCA1效应值大小均依次为: I < II < III < IV,同样反映出不育系随着播期推迟,花粉育性波动越大。分析基因型与播期的互作效应,两者之间的相互作用并非单向。当基因型和播期的IPCA效应值同为正或负时,表现为正向互作;当其中一个为正而另一个为负时,则呈现为负向互作。珍汕97A在I、II播期,基因型和播期的IPCA1均为负值,显示出正向的互作效应,而在III、IV播期,播期的IPCA1转为正值,因此它们之间的关系转变为负向互作;京福1A和301A的表现则相反,在I、II的2个播期内,基因型IPCA1均为正值,播期IPCA1均为负值,表现为负向互作效应,而在III、IV播

表 2 不育系4个播期AMMI模型方差分析

Table 2 AMMI analysis of variance for the CMS lines on 4 sowing dates

变异来源	df	福州						沙县					
		黑染花粉率(%)			嵌合颖花率(%)			黑染花粉率(%)			嵌合颖花率(%)		
		SS	MS	F	SS	MS	F	SS	MS	F	SS	MS	F
总变异	59	517.481	8.771		266.627	4.519		635.302	10.768		297.718	5.046	
基因型	4	243.192	60.798	34.299**	126.459	31.615	31.485**	353.095	88.274	56.134**	137.690	34.422	31.022**
播期	3	173.001	57.667	32.532**	59.491	19.830	19.749**	189.048	63.016	40.072**	75.096	25.032	22.559**
交互作用	12	30.384	2.532	1.428	40.513	3.376	3.362**	30.256	2.521	1.603	40.547	3.379	3.045**
IPCA1	6	24.350	4.058	4.609**	29.539	4.923	4.075**	25.596	4.266	7.972**	30.639	5.107	31.033**
IPCA2	4	4.273	1.068	1.213	8.558	2.139	1.771	3.590	0.898	1.677	9.578	2.395	14.552**
误差	40	70.904	1.773		40.165	1.004		62.902	1.573		44.385	1.110	

表 3 基因型和播期在交互效应显著轴上的分值

Table 3 The scores of significant axes for genotype and sowing date

不育系或播期	福州						沙县					
	黑染花粉率(%)			嵌合颖花率(%)			黑染花粉率(%)			嵌合颖花率(%)		
	平均值	IPCA1	IPCA2	平均值	IPCA1	IPCA2	平均值	IPCA1	IPCA2	平均值	IPCA1	IPCA2
珍汕97A	2.176	-1.437	-0.186	0.410	-0.999	-0.364	1.738	-1.308	-0.017	0.636	-0.960	0.148
龙特浦A	8.420	0.232	0.781	4.594	0.514	1.032	9.287	-0.340	-0.403	5.336	1.009	0.915
野香A	5.899	0.027	0.275	2.743	-0.848	0.218	6.668	0.196	0.864	2.716	-0.855	0.247
京福1A	5.462	0.719	-0.216	2.835	0.301	-0.282	5.666	0.743	-0.429	2.589	0.087	-0.587
301A	6.303	0.459	-0.654	4.103	1.032	-0.604	5.928	0.710	-0.014	3.442	0.719	-0.723
播期 I	3.459	-1.003	0.605	1.707	-1.260	0.613	3.577	-1.200	0.530	1.702	-1.104	0.706
播期 II	4.894	-0.490	-0.403	2.435	-0.289	-1.081	5.101	-0.397	-0.853	2.441	-0.620	-1.029
播期 III	6.180	0.253	-0.668	3.211	0.409	0.102	6.321	0.954	0.290	2.896	0.632	0.459
播期 IV	8.075	1.240	0.467	4.395	1.140	0.366	8.430	0.643	0.033	4.735	1.092	-0.136

期,播期IPCA1转为正值,因此表现正向互作。

2.5 不同播期CMS不育性稳定性分析

黑染花粉率和嵌合颖花率的平均值是衡量花粉败育程度的关键指标值,分值越小,花粉败育越彻底。从表4可以看出,5个不育系中珍汕97A的花粉育性平均值最低,并且该基因型效应值为负,表明花粉败育彻底,育性波动小,对播期反应不敏感。不育系龙特浦A的表现则不同,花粉育性平均值在5个不育系中位列最高,其基因型效应值为正,说明花粉败育不够彻底,育性波动大,对播期等外部环境敏感。野香A、京福1A和301A花粉育性平均值虽然高于珍汕97A,但基因型效应值较低,甚至部分为负值,说明这3个不育系不育性稳定性不及珍汕97A,但花粉育性对播期的敏感性比龙特浦A低。5个不育系的育性关键指标多重比较也可看出,野香A、京福1A和301A花粉不育稳定性不及珍汕97A,

但比龙特浦A好。值得注意的是,珍汕97A的2个花粉育性指标的变异系数明显大于其他不育系,表明在微效恢复基因与播期的交互作用下,珍汕97A的基因累积效应显著,从而导致产生黑染花粉粒和嵌合体的频率差异较大。由于微效恢复基因为数量性状遗传,且主效基因型与播期互作,龙特浦A、野香A、京福1A和301A对播期的敏感度较高,外部因素对花粉不育性的影响尤为显著,可以通过合理安排播期,采取严格隔离和连续割茬的方式进行遗传提纯,达到更佳的种子纯化效果。而对于不育系珍汕97A,变异系数大,但其播期敏感度较低,也可以通过合理安排播期,达到种子纯化的目的。

3 讨论

冬春农田种植烟叶,夏秋进行杂交稻制种或不育系繁殖,这种水旱轮作模式充分合理利用当地温光资

表 4 不同地点和播期交互作用下不育性稳定性参数分析

Table 4 Sterile stability analysis of CMS lines by the interaction between experimental locations and sowing dates

不育性指标	不育系	不育性		稳定性		显著性	
		平均值	效应	方差	变异系数	5%	1%
黑染花粉率	珍汕97A	1.999	-3.764	0.166	20.389	c	C
	龙特浦A	8.853	3.090	0.208	5.148	a	A
	野香A	6.283	0.520	0.149	6.146	b	B
	京福1A	5.564	-0.199	0.000	0.229	b	B
	301A	6.115	0.352	0.178	6.895	b	B
嵌合颖花率	珍汕97A	0.523	-2.417	0.024	29.637	c	C
	龙特浦A	4.965	2.025	0.270	10.468	a	A
	野香A	2.730	-0.211	0.001	0.885	b	B
	京福1A	2.712	-0.228	0.032	6.583	b	B
	301A	3.772	0.832	0.223	12.513	ab	AB

源,对于烟叶而言可改良土壤土质,减药减肥和减少病虫害,有利烟叶提质增产和烟农增收;对于繁殖制种而言,比单季制繁种多收一季烟叶,比连晚制繁种更有季节优势,而且种子产量高、纯度高、商品性好.由于经济效益高,烟后制种和繁殖逐渐成为南方制种区域主推的乡村产业振兴、农业增效、农民增收的种植模式.

本试验应用AMMI模型的分析方法,在烟后水稻制种和繁殖期,对5个CMS的播期效应进行研究,结果表明,龙特浦A等CMS的不育性表达,以主效基因控制为主,存在数量不等且具累加效应的微效基因,受播期因素影响.不同播期下,各CMS黑染花粉率和嵌合颖花率显示显著差异,花粉不育稳定性从低到高依次为龙特浦A、301A、野香A、京福1A、珍汕97A,对播期敏感度效应从大到小依次为:龙特浦A、301A、京福1A、野香A、珍汕97A.结合花粉育性指标聚类分析,龙特浦A的微效恢复基因数量为较多类型,对播期反应较敏感;野香A、京福1A、301A的微效恢复基因数量为中间类型,对播期存在一定程度的效应;珍汕97A为微效恢复基因数量较少类型,对播期反应敏感度低.花粉育性遗传不仅受主效恢复基因控制,还受微效恢复基因的累积影响,导致不育系中黑染花粉粒增多和花粉嵌合体的形成.花粉嵌合体数量越多,微效恢复基因的累积也越多,花粉不育稳定性越差,对播期更为敏感.根据不育系的播期和育性表达影响因素,在生产上烟后制繁种时,播期适当提前对于不育系种子纯化效果较好,尤其是龙特浦A、301A、京福1A、野香A为代表的含有一定数量微效恢复基因类型不育系,合理安排播期十分关键.在不育系遗传选育和

原种提纯时,选择微效恢复基因高效表达的播期进行,有利于及早剔除不合格单株,加快获得不育性稳定的群体. AMMI模型可以客观反映不同播期下不育系花粉育性的波动规律,以及基因型与播期之间的互作特性.在互作项中,通过显著IPCA1计算获得稳定性参数估算值,作为分析基因型与环境互作模式的依据,并界定CMS的花粉不育的稳定性.本试验中IPCA1与IPCA2之和占交互作用的94%以上,说明该模型相应参数的预测估计值准确度较高.其中IPCA2的变异平方和在交互作用变幅区间为11.87%~23.62%,在沙县试验点嵌合颖花率IPCA2达极显著水平,表明IPCA2的作用不应忽视.

细胞质雄性不育系存在不同程度的花粉不育基因遗传不稳定性现象,不同微效数量性状位点与它们的遗传背景密切相关^[27].李新奇等人^[28]研究指出,每个花粉育性数量性状位点都可以产生部分败育现象,但其效应小,且多数为隐性或部分隐性,属于微效基因类型.由于育性的波动和反复,黑染花粉粒和嵌合颖花是其表型特征^[12].我们研究认为,CMS的育性回复除受主效基因控制外,微效基因也产生累加作用,黑染花粉粒和嵌合体回复出现的频率与微效恢复基因数量有关,是自交结实和产生杂株的主要内因.本研究另外表明,黑染花粉率、嵌合颖花率和套袋自交结实率3个花粉育性指标两两之间均呈极显著正相关,具相互替代性,根据黑染花粉率或嵌合颖花率与套袋自交结实率的幂函数关系式计算可获得不育系自交结实产生的混杂率.采用这3个指标来检测微效恢复基因的表现,符合可量化指标的要求,同时可在一定程度上反映微效恢复基

因数量和花粉育性表现, 是主效和微效育性恢复基因研究中常用的考查指标, 但套袋自交结实率在花粉发育、开花受精过程中不可避免受生理、生态等环境因素影响, 不能真实反映不育系的恢复性, 而黑染花粉率和嵌合颖花率则反映的是花粉不育系稳定性的遗传特

性. 当样本容量较大时, 利用黑染花粉率指标时需要对群体中所有稻穗进行花粉染色镜检, 工作量大且操作困难. 而嵌合颖花率较易区分不育系微效恢复基因的表现, 操作相对简便, 适合作为主效和微效恢复基因遗传分析及育性考查的量化指标^[22,26].

参考文献

- 1 Yuan L P. A preliminary report on male sterility in rice, *Oryza sativa* L. (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 1966, 17: 185–188 [袁隆平. 水稻的雄性不孕性. 科学通报, 1966, 17: 185–188]
- 2 Mao C X, Virmani S S, Kumar I. Technological innovations to lower the costs of hybrid rice seed production. In: Virmani S S, Siddiq E A, Muralidharan K, eds. *Advances in Hybrid Technology*. International Rice Research Institute, Los Baños, 1998. 118–128
- 3 Zhou T L, Zhen X P, Chen J Q, et al. Studies on the origin and genetic analysis of abnormal plants appeared in MS lines of rice (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 1992, 18: 9–16 [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. 作物学报, 1992, 18: 9–16]
- 4 Zeng Q C, Zhou K D, Zhu Z, et al. Current status in the use of hybrid rice heterosis in China (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 2000, 14: 243–246 [曾千春, 周开达, 朱祯, 等. 中国水稻杂种优势利用现状. 中国水稻科学, 2000, 14: 243–246]
- 5 Duroc Y, Gaillard C, Hiard S, et al. Nuclear expression of a cytoplasmic male sterility gene modifies mitochondrial morphology in yeast and plant cells. *Plant Sci*, 2006, 170: 755–767
- 6 Fu H W, Xue Q Z. Analysis of restoring genes of three type of cytoplasmic male sterility in rice (in Chinese). *Mol Plant Breed*, 2004, 2: 336–341 [富吴伟, 薛庆中. 三种水稻胞质雄性不育恢复基因的比较. 分子植物育种, 2004, 2: 336–341]
- 7 Lee D S, Chen L J, Suh H S. Genetic characterization and fine mapping of a novel thermo-sensitive genic male-sterile gene *tms6* in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1271–1277
- 8 Tao D, Xu P, Li J, et al. Inheritance and mapping of male sterility restoration gene in upland japonica restorer lines. *Euphytica*, 2004, 138: 247–254
- 9 Luan J, Liu T, Luo W, et al. Mitochondrial DNA genetic polymorphism in thirteen rice cytoplasmic male sterile lines. *Plant Cell Rep*, 2013, 32: 545–554
- 10 Luo D, Xu H, Liu Z, et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nat Genet*, 2013, 45: 573–577
- 11 Lei J C, You N S, Zhen X P. Genetic analysis for breeding maintainer line of male sterility of wild rice with abortive pollen (in Chinese). *Sci Agricult Sin*, 1984, (5): 30–34 [雷捷成, 游年顺, 郑秀萍. 野败型水稻雄性不育系保持系选育的遗传分析. 中国农业科学, 1984, (5): 30–34]
- 12 You N S, Huang L X, Lei S P, et al. Rice mini-efficient restoring gene and practice for breeding male sterile line (in Chinese). *Acta Agricult Univ Jiangxiensis*, 2003, 25: 487–492 [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. 江西农业大学学报, 2003, 25: 487–492]
- 13 Gu H Q, Xiang Z P, Liu S, et al. Association between temperature and fertility of CMS lines in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *Life Sci Res*, 2017, 21: 144–148, 173 [顾华琴, 向志攀, 刘赛, 等. 水稻三系不育系育性与温度关系研究. 生命科学研究, 2017, 21: 144–148, 173]
- 14 Gao M L, Feng J C, Wang X Z, et al. Utilization of Longtepu A and its improvement (in Chinese). *Hybrid Rice*, 2001, 16: 5–6 [高明亮, 冯建成, 王雪珍, 等. 龙特浦A的利用及其改良研究. 杂交水稻, 2001, 16: 5–6]
- 15 Guo J F, Wei H, Wang F Q, et al. Study on the fertility stability of rice-Longtepu A in Zhangjiang (in Chinese). *J Anhui Agricult Sci*, 2007, 35: 2540–2542, 2559 [郭建夫, 魏荷, 王丰青, 等. 龙特浦A在湛江的育性稳定性研究. 安徽农业科学, 2007, 35: 2540–2542, 2559]
- 16 Zheng X P, Zhou T L, Zhang G Z, et al. Studies on the origin of extraneous plants in rice CMS line of Longtepu A (in Chinese). *Hybrid Rice*, 1998, 13: 8–10 [郑秀萍, 周天理, 张功宙, 等. 龙特浦A杂株来源及其分析. 杂交水稻, 1998, 13: 8–10]
- 17 Zhou T L, Zheng X P, Cheng D, et al. Effect of photoperiods on fertility of cytoplasmic male sterile lines in rice (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 2000, 14: 247–248 [周天理, 郑秀萍, 陈丹, 等. 光照长度对三系杂交水稻不育系育性影响的研究. 中国水稻科学, 2000, 14: 247–248]
- 18 Xi J M, Zhang X F, Tang Y L, et al. A preliminary study on relation of fertility to temperature and photoperiod in *indica* CMS lines of rice (in Chinese). *Hybrid Rice*, 2011, 26: 72–75 [席建民, 张雄飞, 唐亚林, 等. 籼型三系不育系育性与温、光的关系初探. 杂交水稻, 2011, 26: 72–75]
- 19 Lin Q, Zheng Y M, Xie H G, et al. Analysis of the fertility sensitivity to temperatures of sowing dates of CMS-WA in rice (in Chinese). *J Nanjing Agricult Univ*, 2020, 43: 18–25 [林强, 郑燕梅, 谢鸿光, 等. 水稻CMS-WA育性对播栽温度敏感性分析. 南京农业大学学报, 2020, 43: 18–25]
- 20 Lin Q, Luo X, Xie H G, et al. Analyze of the fertility sensitivity by photoperiods and temperatures of duration of cultivation to CMS-WA in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *J Agricult Biotechnol*, 2020, 28: 22–31 [林强, 罗曦, 谢鸿光, 等. 水稻CMS-WA育性的光温敏感性分析. 农业生物技术学报, 2020, 28: 22–31]
- 21 Zhou T L, Chen J Q, Zhen X P, et al. A method for genetic improvement of rice male sterile line (in Chinese). *Sci Agricult Sin*, 1992, 25: 22–27 [周天理, 陈金泉, 郑秀萍, 等. 水稻不育系遗传提纯及其效果研究. 中国农业科学, 1992, 25: 22–27]

- 22 Fu H W, Li Y F, Ma X H, et al. Study on phenotype of restoring gene with minor effect in three-line sterile lines in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). Crop Res, 2010, 24: 8–11 [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. 作物研究, 2010, 24: 8–11]
- 23 Tao H, Xue Q Z. AMMI analysis of genotype by sowing date interaction reveals the fertility sensitivity to photoperiod and temperature of P(T) GMS rice (in Chinese). Acta Agron Sin, 2005, 31: 1586–1592 [陶华, 薛庆中. 应用基因型与播期互作效应分析水稻光温敏核不育系对光周期和温度的育性敏感性. 作物学报, 2005, 31: 1586–1592]
- 24 Zhou T L, Shen J H, Ye F C. A Genetic analysis on the fertility of Shan type hybrid rice with wild rice cytoplasm (in Chinese). Acta Agron Sin, 1983, 9: 241–247 [周天理, 沈锦骅, 叶复初. 野败型杂交籼稻的育性基因分析. 作物学报, 1983, 9: 241–247]
- 25 Gao M W. A Preliminary analysis of the genotypes of hybrid Shen rice with wild rice cytoplasm (in Chinese). Acta Genet Sin, 1981, 8: 66–71 [高明尉. 野败型杂交籼稻基因型的初步分析. 遗传学报, 1981, 8: 66–71]
- 26 Lin Q, Zheng Y M, Zhang J F, et al. Genetic analysis for phenotype of restoring gene with minor effect in CMS-WA in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). Fujian J Agric Sci, 2013, 28: 872–875 [林强, 郑燕梅, 张建福, 等. 水稻CMS-WA微效恢复基因的遗传分析. 福建农业学报, 2013, 28: 872–875]
- 27 Xie J K, Shu Q Y, Chen D Z, et al. The inheritance of the fertility restoration of cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci), 2002, 28: 373–378 [谢建坤, 舒庆尧, 陈大洲, 等. 水稻细胞质雄性不育育性恢复遗传研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28: 373–378]
- 28 Li X Q, Xu Y B, Xiao J H, et al. Studies on mapping and discarding of minor fertility genes in rice CMS lines (in Chinese). Hybrid Rice, 2010, S1: 276–281 [李新奇, Xu Yunbi, Xiao Jinhua, 等. 水稻质核互作雄性不育系的微效恢复基因定位和排除方法研究. 杂交水稻, 2010, S1: 276–281]

Summary for “应用微效恢复基因与播期互作效应分析水稻CMS的育性敏感性”

Analysis of interaction between minor-effect restoring gene and sowing date reveals the fertility sensitivity to CMS lines in *indica* rice

Qiang Lin^{1,2†}, Qiuhua Cai^{1,2†}, Yingheng Wang^{1,2}, Lili Cui^{1,2}, Liping Chen^{1,2}, Jiahuang Jiang^{1,2}, Yanjia Xiao^{1,2} & Jianfu Zhang^{1,2*}

¹ Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350019, China;

² Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding of Hybrid Rice for South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Fuzhou Branch, National Rice Improvement Center of China / Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding / Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding / Incubator of National Key Laboratory of Fujian Germplasm Innovation and Molecular Breeding between Fujian and Ministry of Sciences & Technology, China / South China Bases of National Key Laboratory of Hybrid Rice for China/ National Rice Engineering Laboratory of China, Fuzhou 350003, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: jianfzhang@163.com

In 1960, Longping Yuan serendipitously discovered a natural hybrid rice variety with distinct advantages over others in an experimental field. After extensive research and exploration, he suggested the ‘three-line method’ breeding approach to harness rice heterosis by incorporating male-sterile, maintainer, and restorer lines. He also emphasized that using rice male sterility was the most effective way to solve the problem of large-scale seed production through the exploitation of rice heterosis in 1966. The yield per unit area of hybrid rice increased by approximately 20% compared to conventional dwarf varieties, marking a significant breakthrough in rice production.

Post-tobacco seed production refers to the hybrid rice seed production in farmland after the tobacco harvest. This represents a new farming system model aimed at adjusting the industrial structure of the southern seed production region. Cytoplasmic male sterility (CMS) lines are the cornerstone of the three-line hybrid rice system. Moreover, the varying degrees of sterility in CMS lines directly impact the seed purity of hybrid rice. This experiment was carried out during the post-tobacco seed production period to explore the genetic basis of dark pollen using I₂-IK dyeing and florets with fertile anthers, which were caused by the interaction between restoring genes with a minor-effect restoring genes and other factors. The study was conducted using four sowing dates and two experimental locations to observe changes in male fertility among five CMS lines (Zhenshan 97A, Longtepu A, Yexiang A, Jinfu 1A, and 301A), which contain different numbers of restoring genes. The rates of dark pollen dyed by I₂-IK and florets with fertile anthers were analyzed using the additive main effects and multiplicative interaction model (AMMI).

The results indicate that the recovery of CMS fertility is not only impacted by major genes but also by the cumulative effects of minor genes. Longtepu A should be categorized as a type with a relatively large number of minor effect-restoring genes, making it more sensitive to changes in sowing dates and experimental locations. Yexiang A, Jinfu 1A, and 301A were categorized as intermediate types of minor-effect restoring genes, demonstrating some degree of response to factors such as sowing dates. Zhenshan 97A was identified as a type with a relatively small number of minor-effect restoring genes and low sensitivity to sowing time. The sensitivity of CMS lines to sowing dates, ranked from highest to lowest, is as follows: Longtepu A, 301A, Jinfu 1A, Yexiang A, and Zhenshan 97A. In order to ensure seed purity during post-tobacco seed production and reproduction, it is recommended to advance the sowing date appropriately based on the impact of sowing dates on the sterility of CMS lines. Furthermore, genetic breeding and purification of CMS lines should be conducted at sowing dates when the minor-effect restoring gene is highly expressed. This approach will facilitate the early elimination of unqualified individual plants or lines and accelerate the development of a stable population with infertility.

rice, cytoplasmic male sterility (CMS), pollen fertility, minor-effect restoring gene

doi: [10.1360/TB-2024-0393](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0393)