

综述与专论

植物细胞质雄性不育系育种的反向核 置换技术分析^①

^{1,2} 李新奇 ^{1,2} 袁隆平^② ² 肖金华 ² 邓启云

¹(中南大学生物科学与技术学院 长沙 410083)

²(国家杂交水稻工程技术研究中心 长沙 410125)

摘要 通过不育细胞质为选择背景,在田间事先鉴定出杂种后代的优异完全不育株,用花药培养或诱导孤雌生殖使其纯合,测定其配合力,可以筛选到优良的目标不育系。以下3种方法则可能通过目标不育系而获得其同型保持系:一是通过体细胞变异(花药培养)产生;二是在不育系孕穗期高温或低温处理使其转换成可育,选择仍具有不育保持能力的作为保持系,或作为轮回亲本,将其细胞核换到可育细胞质中;三是用原生质体融合的方式向不育系导入已杀死细胞核的可育细胞质而获得配套保持系。它可以使杂种优势利用变得有预见性,可能提高现有杂种优势水平。在创造雄性不育新质源,排除微效可育基因,进行不育系的定向改造,选育高配合力不育系,以及加速育种进程等方面具有重要价值。

关键词 胞质雄性不育, 育性转换, 单倍体育种, 反向核置换, 原生质体融合

Breeding of Elite CMS Lines by Reverse Nuclear Substitution

^{1,2}LI Xin-Qi ^{1,2}YUAN Long-Ping^② ²XIAO Jin-Hua ²DENG Qi-Yun

¹(Biological Science & Technology College, Central South University, Changsha 410083)

²(China National Hybrid Rice Research & Development Center, Changsha 410125)

Abstract It was very difficult to specifically identify the maintainability of a plant line unless it is genetically stable and its whole nuclear genome has completely replaced in the CMS (cytoplasmic male sterile) line. To overcome this problem, a breeding method was proposed in this paper. The breeding procedure includes: (1) screening elite male sterile plants from segregating populations using male sterile cytoplasm as background selection; 2) getting genetically stable CMS lines via anther culture or parthenogenesis; (3) selecting target CMS lines with good combinability, restorability, outcrossing habit, grain quality and resistance to pests and diseases; (4) converting target CMS lines into maintainers by the following approaches: (a) to obtain fertile mutants of target CMS lines by further anther culture; (b) to make the target CMS line fertile by high temperature treatment at young panicle stage, then to select maintainers through screening their offspring, or through nuclear substitution using their offspring as male recurrent parent; (c) to irradiate to the obtain hybrids between CMS cells and radiated

① The Rockefeller Foundation 和湖南省自然科学基金会部分资助项目。

② 通讯作者。Author for correspondence.

收稿日期: 2003-05-12 接受日期: 2003-01-22 责任编辑: 崔郁英

normal cells via protoplast fusion and screen fertile plants as new maintainers.

Key words CMS, Fertility reversion, Haploid, Reverse nuclear substitution, Protoplast fusion

三系法杂种优势的缺点是可利用的亲本有限。以水稻(*Oryza sativa* L.)为例,常规籼稻品种中,野败保持系频率低于0.1%。微效可育基因的存在是水稻等细胞质雄性不育系选育的一个主要障碍,它导致不育系自交结实。目前还没有比较有效的育种方法来排除水稻亲本中的微效可育基因。在杂交选育雄性不育系的保持系时,一般是利用某保持系与另一亲本杂交,在杂种后代中选择单株与不育系测交,如果它们的测交 F_1 不育,则选留该单株作为今后保持系的测试株系。这种做法在实践中的结果是不准确的。由于杂交后代单株及其与不育系的测交后代群体是分离的,微效可育基因也是分离的。由此判断一个杂交后代单株是否为保持株系不会准确。理论上,只有当一个稳定的品系的细胞核完全被代换到不育细胞质中,才能准确了解这个品系是否为保持系以及开花习性是否优良。因此,在育种实践中鉴定杂交后代单株的不育保持能力和开花习性事先没有预见性,容易造成最后获得的不育系其败育欠彻底或开花习性不良。当微效可育基因较多时,选育的效率很低。目前,由于不育系遗传单一,生产上缺乏高产优质的杂交粳稻组合和适合长江流域作双季早稻的早和中熟组合,杂交中晚稻产量则呈现徘徊局面。

植物中不育细胞质类型丰富,有很多不育细胞质由于难找到完全不育保持系,其不育系大多败育不彻底,没能得到利用。主要是微效可育基因难以排除。如普通小麦种内胞质互作产生的一些不育系,它们一般更易恢复,配组更自由,但败育很难彻底。生产中由于波利马不育系败育不彻底,导致杂交油菜的纯度较低,影响杂交油菜的产量(杨光圣和傅廷栋,1987)。

如果能够通过杂交育种以不育细胞质为选择背景,在田间事先鉴定出优异的完全不育株,纯合成优良高配合力不育系,测配到优异的目标组合,可以利用某些方法通过不育系再来获得其同型保持系。它就具有强的目标性和预见性,有利于提高细胞质雄性不育系的配合力和培育不同类型优异的不育系。细胞质雄性不育系选育的常规技术是将保持系细胞核置换到不育细胞质中,先育成保持系后再由其转育不育系。本文探讨的选育技术与其相反,是将不育系细胞核转换到可育细胞质中,先获得不育系后再由其转育保持系。所以我们称其为反向核置换。今后希望通过它能够达到较大幅度扩大新不育系与现有不育系的遗传差异,提高现有杂种优势水平的目的。利用花药培养和诱导孤雌生殖纯合和杂合不育株而筛选到优异的目标不育系是可行的。基于前人的研究和我们以前的工作,目前我们认为至少有3种方法能够通过不育系而获得不育系的同型保持系。一是通过花药培养产生;二是不育系花粉形成过程中高温或低温处理能够转换成可育,并具有不育保持能力;三是用原生质体融合的方式向不育系导入已杀死细胞核的可育细胞质而获得配套保持系。

1 反向核置换技术的潜在意义

1.1 新不育细胞质的创建和利用

通过种间、亚种间或品种间杂交,细胞质和细胞核的互作能够产生雄性不育,从而可以获得新的雄性不育细胞质源。实践中一些不育细胞质源在现有作物品种中难以测到完全保持系,因此没能得到利用,但它们一般具有育性易恢复和配组更自由的优势。利用反向核置换技

术可能为其得到完全保持系。做法是通过种间、亚种间或品种间杂交,产生完全不育株后,再经过单倍体育种,得到遗传纯合的完全不育株。而后利用反向核置换技术获得其保持系。这样,所谓不能保持的不育细胞质源也可能通过反向核置换技术而得以利用。

1.2 排除微效可育基因

目前波利马油菜细胞质雄性不育系,水稻BT型粳稻不育系及红莲型籼稻不育系等一般败育不彻底,很难选择到完全的保持系。如果以不育细胞质为选择背景,用几个油菜保持品种或水稻品种为父本复交,通过基因重组,直接观察到微效可育基因的表达而将它们排除,从而获得败育彻底的不育株,再通过单倍体育种,得到纯合的雄性不育后代。

1.3 不育系的定向改造

育种中常发现某些亲本具有很好的配合力,但不具或不完全具有保持能力,或具有某些其他缺点,如水稻优良广亲和系培矮64。通过该方法,应用下列方式则可能将培矮64转育成优良保持系。

V20A/培矮64 $\rightarrow$ F₂优良不育株/培矮64 $\rightarrow$ BC₁F₂优良不育株/培矮64 $\cdots\cdots$ $\rightarrow$ BC_nF₂优良不育株,再通过花药培养获得与培矮64相似的纯合优异不育株。

1.4 选育高配合力不育系

通过扩大与现有保持系的遗传差异,协调开花习性与不育性的关系,可以鉴定筛选出高配合力不育株。例如绝大部分粳稻对野败是保持的,如能育成优良野败粳稻不育系,则可以将现有籼型品种间杂交稻优势提高到籼粳亚种间水平。但一般野败粳稻不育系开花习性太差,不具实用性。通过不育细胞质为选择背景和基因重组,可能解决这一问题。

1.5 加速育种进程

反向核置换技术所需育种周期一般只要2~3年,能节省育种时间3~5年。

2 反向核置换技术的理论基础

2.1 通过体细胞变异,不育细胞质可转换为可育细胞质

Burton (1977)等从玉米(*Zea mays*)、狼尾草(*Pennisetum alopecuroides* (L.) Spreng.)和水稻等植物细胞质雄性不育系的培养物中获得了雄性可育的突变,后来证实这种突变是由于不育系的细胞质线粒体DNA发生了突变所致,即由雄性不育的细胞质变为育性正常的细胞质(Burton, 1977; Gengenbach *et al.*, 1978; Brettell *et al.*, 1980; Umbeck and Gengenbach, 1983; Nawa *et al.*, 1987; Rottmann *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1987; Earle *et al.*, 1987)。范树国和梁承邨(1995)发现红源A花药培养R₁代中可育、低不育和半不育株比例占4.6%;包源A花药培养R₁代中可育、低不育和半不育株分别占0.96%, 0.6%和0.36%;珍汕97A花药培养R₁代中可育和半不育株占2.46%和0.29%。可以看出,通过花药培养,不育系转换成为可育或半不育株的频率很高。事实上,许多完全不育的胞质雄性不育系也产生一些可育花粉,可育花粉粒的生长发育后代可能较易表现可育。

2.2 胞质雄性不育系在花粉发育期高温或低温处理能够转换成可育

目前实用油菜(*Brassica campestris* L.)细胞质雄性不育系败育不彻底,总能产生散粉的花朵,以其为父本,结合回交,可以将不育系的细胞质换成可育细胞质;对于某些细胞质雄性不育系,其花药本身含有可育花粉,只是不开裂而表现不育。不同胞质不育系的花粉可育度和开花

散粉程度受外界温度的影响。20世纪70年代,人们曾用破碎花药的办法来繁殖小麦潍型核不育系。利用上述方法,可以将不育系的细胞质通过回交换成可育细胞质。

环境温度的变化导致细胞质雄性不育系育性转换的现象具有普遍性。大多油菜细胞质雄性不育系在开花前10 d左右如遇低温(日均7℃左右)育性部分恢复。水稻等细胞质雄性不育系在孕穗期遇高温或结合再生,能够转换为部分可育或者可育。蒋义明(1988)发现高温处理可以使滇型水稻雄性不育系部分可育,而产生的可育后代仍然具有完全不育保持能力。我们在实践中也观察到,经过高温处理,得到的水稻野败不育系自交后代不育保持能力没有改变。许仁林和易琼华(1991)研究了高温对两个水稻雄性不育系珍汕97A和协青早A育性的影响,发现高温诱变的可育特性能传递下去,不过高温对它的表达有较大的影响。他们认为细胞质雄性不育系的核基因上同样存在可育基因,正常温度下,可育基因可能受到细胞质雄性不育因子的抑制而不能表达或表达不完全,使不育系表现为不育;高温能使温敏调控基因启动,可能通过解除细胞质雄性不育因子的抑制而使可育基因得到表达。

2.3 通过原生质体融合能够传递细胞质

原生质体融合在许多植物中都是成功的。利用原生质体融合将保持系原生质体细胞核转入不育细胞质的育种途径中,需要用碘醋酸等抑制保持系的原生质体的细胞质,因为将不育细胞质与可育细胞质融合得到的后代仍然是可育细胞质。采用反向核置换法时,利用目标不育系的原生质体与一个已破坏细胞核的可育系原生质体融合,可以得到具有目标不育系细胞核和可育细胞质的目标保持系。做原生质体融合时,不育细胞质也可以通过碘醋酸处理得到抑制。同种内的原生质体融合再生相对容易得多,粳稻和甘蓝型油菜等材料原生质体融合再生的效率较高。

3 反向核置换技术的育种程序

3.1 目标不育系的获得

采用现有优良细胞质雄性不育系或创建的新细胞质不育系/某一亲本,或/亲本A/亲本B/亲本C等多种复交或回交方式,通过广泛杂交,改变不育系遗传背景单一的状况,扩大亲本之间的差异,获得性状优异的符合育种目标的杂合不育株。如杂交或回交 F_1 不育,选不育株;如部分可育,种植杂交或回交 F_2 ,分离不育株。在田间杂种后代群体中,选择到不育性好、开花习性优异、农艺性状优良和抗性好的优异不育单株。

通过单倍体育种将所选择到的优异不育单株纯合稳定,选择其中不育性好、配合力好、开花习性优异、农艺性状优良、可恢复性好、抗性好和所配杂种品质好的优异的目标不育株,分苑保存,测配优良杂交组合,鉴定其遗传稳定性和高配合力的优异纯合不育株当选为目标不育系。孤雌生殖诱导有利于选育目标不育系,雄性不育性与孤雌生殖有一定关系,小麦的K、V和T型不育系本身就容易产生单倍体(邹吉承,2000),许多不育系单倍体频率在5%以上。而且诱导不育株孤雌生殖时不要去雄,可以有大量的颖花供诱导处理。花药培养则可以在粳稻,甘蓝型油菜等材料上有较高的育种效率。波利马甘蓝型油菜不育系被认为属无花粉败育型,但一般败育不彻底,仍有少量花粉,需要研究它们是否可以通过花药培养获得败育程度高的不育系。

3.2 目标组合的获得

目标不育系与优良的恢复系测交配组,进行组合田间试验。筛选比生产上当家杂交组合更

好的目标组合及其目标恢复系。

3.3 目标不育系的保持系的获得

(1) 对目标不育系进行花药培养,筛选可育的突变体,可能获得目标保持系,同时具有进一步的纯合作用。

(2) 胞质不育系在花粉形成过程中高温或低温处理,结合再生,使其转换为部分可育或者可育。在后代中筛选高可育株,鉴定植株不育保持能力,获得目标保持系;或每代经过高温处理,用转换为部分可育的单株作为父本及轮回亲本与常规品种进行回交,将其核代换到可育细胞质中,得到目标保持系。

(3) 用一个常规品种的原生质体作为可育细胞质供体,用 γ 或x射线处理消除其细胞核活性,目标不育系的原生质体直接作为细胞核供体或用碘醋酸处理,用PEG或电激,将此两种原生质体融合并再生。融合再生的单株具有可育的细胞质和目标不育系的细胞核,即为目标不育系的保持系。

3.4 应用

利用保留的目标不育系禾菀与其保持系杂交而繁殖不育系,与目标恢复系杂交生产目标组合种子。

5 前景展望

单倍体育种和原生质体融合已比较广泛地应用于细胞质雄性不育系选育研究。例如许多人分别以 γ 或x射线破坏水稻雄性不育系的细胞核,用碘醋酸抑制育性正常水稻的细胞质,然后将这两种水稻原生质体做细胞杂交,通过原生质体融合将保持系细胞核转入不育细胞质中,直接获得新的雄性不育系(Yang, 1989; Kyo-zuka *et al.*, 1989; Akagi *et al.*, 1995; Gupta, 1996; Bhattacharjee *et al.*, 1999)。但是,同种内原生质体融合再生利用研究过多集中在将某些保持系品种直接转育为不育系,其主要作用是节省回交时间。

从花药培养和原生质体融合技术的特点看,它们更适合于培育杂交作物的优良亲本。常规良种要求很全面,不是表现非常突出的品种难以得到应用。杂交作物亲本的价值大小一般则取决于它的一般配合力和配组的特殊配合力,相对来说,对本身产量和综合性状要求不很严格。有某些缺陷和不足也可能在配组后得到补充。例如,花药培养在早世代选择,在早世代稳定,但在早世代选择优良高产的常规良种几率不高,因为产量性状在早世代的遗传力相当低,但是杂交作物育种主要是对其亲本的遗传背景和外观农艺性状的选择,遗传背景在杂交配组时就已经基本决定,且单个农艺性状的遗传力一般都比较低,在早世代稳定有效。对于反向核置换技术,花药培养和原生质体融合再生的效率在某些材料中可能较低,但由于一个组合基本上只需获得一株原生质体融合再生的可育苗子,就能得到目标保持系,像水稻上一个优良不育系其价值可达数千万元以上。关键之处应该是能否容易获得充分好的杂合不育株用于单倍体育种。田间种植杂种后代群体可以非常大,成本低,田间鉴定也能做到非常准确。获得充分好的杂合不育株不难。而且有些油菜等作物原生质体融合再生的效率是较高的。如果该方法能产生较高的实际效益,它能反过来促进育种效率的提高。我们希望通过反向核置换技术得到‘最好’的不育系。对于创造新的雄性不育细胞质源和为很难保持的新不育细胞质创造完全不育保持系,反向核置换技术能够有独特作用。如果利用梗稻作为研究材料,可以提高花药培养和原生质体

融合再生的效率。可能为生产上急需的粳稻不育系选育创造出有效方法。

花药培养及原生质体融合后代中有部分单株会产生体细胞变异,只要不影响不育性和开花习性,这些变异可能是允许的。其好处是可能从一个原生质体融合的后代中获得不同类型的保持系和不育系。

作物品种杂交化是农作物育种的发展趋势。一是由于杂种优势的存在;二是种植者自己不能留种,经营者有利可图。育种单位将采取很多可能的途径来提高杂交作物的选育效率,反向核置换技术能够有广阔的前景,值得进一步研究。

参 考 文 献

- 许仁林, 易琼华, 1991. 高温对两个水稻雄性不育系育性影响的研究. 杂交水稻, 1: 39~42
- 杨光圣, 傅廷栋, 1987. 环境条件对油菜细胞质雄性不育的影响. 中国油料, 3: 5~8
- 邹吉承, 2000. 小麦核质互作雄性不育的研究及利用. 辽宁农业科学, 1: 33~38
- 范树国, 梁承邨, 1995. 水稻体细胞无性系 R_1, R_2 代中雄性育性变异观察. 遗传学报, 22: 293~301
- 蒋义明, 1988. 高温对滇型杂交水稻雄性不育系育性的影响. 云南农业大学学报, 3: 99~107
- Akagi H, Shimada H, Fujimura T, 1995. High-frequency inter-parental recombination between mitochondrial genomes of rice cybrids. *Curr Genet*, 29: 58~65
- Bhattacharjee B, Sane A P, Gupta H S, 1999. Transfer of wild abortive cytoplasmic male sterility through protoplast fusion in rice. *Mol Breeding*, 5: 319~327
- Brettell R I S, Thomas E, Ingram D S, 1980. Reversion of Texas male-sterile cytoplasmic maize in culture gives fertile T-toxin resistant plants. *Theor Appl Genet*, 58: 55~58
- Burton G W, 1977. Fertile sterility maintainer mutants in cytoplasmic male sterile pearl millet. *Crop Sci*, 17: 635~637
- Earle E D, Gracen V E, Best V M, Batts L A, Smith M E, 1987. Fertile revertants from S-type male-sterile maize grown *in vitro*. *Theor Appl Genet*, 74: 601~609
- Gengenbach B G, Walter T J, Green C E, Hibberd K, 1978. Feedback regulation of lysine, threonine, and methionine biosynthetic enzymes in corn. *Crop Sci*, 18: 472~576
- Gupta H S, 1996. Transfer of cytoplasmic male sterility in indica rice through protoplast fusion. *Int Rice Res Notes*, 21(2/3): 33~34
- Kyozuka J, Kaneda T, Shimamoto K, 1989. Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion. *Bio/technol*, 7: 1171~1174
- Nawa S, Sano Y, Yamada M, Fujii T, 1987. Cloning of the plasmids in cytoplasmic male sterile rice and changes of organization of mitochondrial and nuclear DNA in cytoplasmic reversion. *Jpn J Genet*, 62: 301~314
- Rottmann W H, Brears T, Hodge T P, Lonsdale D M, 1987. A mitochondrial gene is lost via homologous recombination during reversion of CMS T maize to fertility. *EMBO J*, 6: 1541~1546
- Smith R L, Chowdhury M K U, Pring D R, 1987. Mitochondrial DNA rearrangements in pennisetum associated with the reversion of cytoplasmic male sterility to fertility. *Theor Appl Genet*, 81: 793~799
- Umbeck P F, Gengenbach B G, 1983. Reversion of male sterile T-cytoplasm maize to male fertility in tissue culture. *Crop Sci*, 23: 584~588
- Yang Z Q, 1989. Plant regeneration from cytoplasmic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 77: 305~310