

## 不育临界温度值不同的培矮64S近等基因系选育\*

曾汉来 张端品

(华中农业大学农学系、作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070)

**提 要** 采用人工控制的系列温度条件, 对光温敏核不育水稻培矮64S-5株系的高世代自交(近交)群体进行单株雄性育性鉴定与系统选择, 再经10代自交纯化, 获得一套不育临界温度分别为23、24、26和28的培矮64S近等基因系。这套材料对研究水稻两用核不育系不育临界温度高低的遗传规律和花粉的育性温度控制机理有重要意义, 其中不育临界温度为23的培矮64S具有较好的不育稳定性和遗传纯合性, 可直接应用于两系杂交水稻生产。

**关键词** 水稻雄性不育; 不育临界温度; 近等基因系; 两系法杂交水稻

## Developing Near Isogenic Lines of Different Critical Male Sterile Temperature of Thermo-photoperiod Sensitive Male Sterile Rice Peiai 64S

ZEN G Han-Lai, ZHAN G Duan-Pin

(Huazhong Agricultural University, Hubei, Wuhan 430070, China)

**Abstract** The male fertility of the thermo-photoperiod sensitive male sterile rice Peiai64S self-cross offspring plants are identified under a series temperature conditions in a group of Phytotrons. The male sterile plants are selected under these different temperature conditions per generation. After 10 generations, we achieved a group of near Isogenic lines (NIL) that with different male sterile critical temperature, but the all other characters are the same. This NILs include P2364S, P2464S, P2664S and P2864S, and the male sterile critical temperature of them is 23, 24, 26 and 28. This NILs are an important materials for studying the genetic rule of male sterile critical temperature of sterile lines using to two-line hybrid rice, and the mechanism of plant male sterility induced by temperature. Otherwise, P2364S has a low critical temperature and has a stable sterility in high natural temperature season used as a sterile line. It has a stable fertility in lower temperature (< 22) and short daylight season to multiply itself. It can be carried out commercially for developing two-line hybrid rice.

**Key words** Male sterile of rice; Critical male sterile temperature; Near Isogenic lines (NIL); Two-line hybrid rice

选育实用型水稻光、温敏核不育系是发展两系杂交稻的基础, 较低的不育临界温度是不育系保持不育稳定性的基本特性。不育临界温度即指不育系在一定光照条件下表现稳定不育的最低温度, 亦称不育起点温度。不育临界温度较高的不育系要求在较高温度下才表现不育, 而在自然生态条件下由于气温的不稳定性, 往往因其不育温度不能满足而转为可育, 因

\* 863计划生物技术领域“八五”、“九五”重大项目研究课题资助(编号: 863-101-01-03、Z16-02-01-05资助)。

收稿日期: 1999-08-06, 接受日期: 2000-04-04

Received on: 1999-08-06, Accepted on: 2000-04-04

而这些不育系的应用范围较窄或没有实用价值。根据我国长江中、下游稻区的历年气温分析,我国专家将实用不育系的不育临界温度指标确定为 $24^{\circ}\text{C}$  或以下,这样的不育系在长日高温季节作为不育系进行杂交种子生产时其不育性才是比较安全的<sup>[1]</sup>。

我国育种家利用光、温敏核不育基因作为不育基因供体转育成了一大批光、温敏核不育系,但多数不育系均存在不育临界温度在后代自交群体中发生不同程度的分离的现象,使得一份不育系经几个世代后,发生平均临界不育温度逐代升高,群体不育稳定性降低,从而变成不合格的不育系,这是两系杂交水稻大面积快速发展的一大障碍<sup>[2]</sup>。为此,袁隆平提出了对一些已在生产上大面积应用的重要不育系,经数代应用后进行再次低温选择,生产“核心种子”以阻止不育临界温度升高的设想<sup>[3~5]</sup>。“八五”期间本研究组接受了鉴定筛选培矮64S核心种子的任务,对国家杂交水稻工程技术研究中心选育、已在生产上应用面积较大的培矮64S-5的高世代混合群体进行了育性低温鉴定选择,并对选择出的各种类型不育株及后代育性表现进行了相关研究,经数年的工作获得了一套不育临界温度值不同的培矮64S近等基因系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 培矮64S-5,国家杂交水稻工程技术研究中心育成<sup>[4]</sup>,系培矮64S中的一个株系后代,1995年5月由湖北省农业科学院提供当年海南春繁的生产用种。

### 1.2 方法

**1.2.1 不育性的温度鉴定方法** 武昌自然条件下5月10播种,3叶期移栽于 $16\text{ cm} \times 20\text{ cm}$ 瓷钵中,每钵5株,置于盆栽场草地自然光温条件下生长。幼穗进入颖花原基分化期(III末)开始进行不同的温度处理,至花粉母细胞减数分裂末期结束,再移至自然条件下抽穗。以温度处理结束后7~12天内抽穗者为有效处理穗,对有效处理穗逐穗进行花粉育性检测,每穗取当日抽出部分的颖花3~5个混合制片镜检,同时套袋,按穗编号,25天后考查结实率,每单株观察3~5穗。

**1.2.2 处理温度设置** 用一组日光型植物生长箱进行不同温度处理,该型生长箱由本研究组与华中理工大学动力系合作设计制造,通过省级成果鉴定,控温精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。采用自然光照,电脑程序自控温度,每小时一个温度变量,两温度变量间呈斜率式平均变化。根据自然气温变化规律<sup>[3]</sup>,日温差设为 $8^{\circ}\text{C}$ ,最高温度设在14:00,最低温度设在5:00。

**1.2.3 育性判别标准** 以花粉碘染率作为主要指标,以自交结实率作为辅助指标。为严格鉴定起见,将可染花粉(黑染花粉+浅染花粉)作为可育花粉,不染花粉作为败育花粉。单株各穗平均败育花粉百分率大于99%且自交结实率为0%作为不育株标准。

**1.2.4 近等基因系生态定向选择与纯化** 对培矮64S-5混合群体按单株编号,在平均温度为 $24^{\circ}\text{C}$ 的低温下选出全部不育株,留稻莩在更低温下或在海南冬繁获得每株后代种子;对余下的可育株稻莩在 $24^{\circ}\text{C}/16\text{h}$ 光照下再生,取基部再生小苗一莩分栽为3份,形成相同的3组,于自然条件下生长,至幼穗分化颖花原基分化期(III末)分别进行平均温度为 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $26^{\circ}\text{C}$ 、 $28^{\circ}\text{C}$ 下的育性鉴定。找出各组处理温度下的不育株和可育株,根据同一编号单株在3种温度条件下的花粉育性表现,划分该单株的起点不育温度。在各不育起点温度下的不育株中选择株型及各外观性状典型一致的单株6~8株,在冬季温室较低温度下按单株收取后代种子。第二年在4种温度下对后代进行育性鉴定与性状选择,第3代形成株系,以后每代进行各株系40~60株的小群体进行育性鉴定和选择,逐代增加选择压力淘汰单株间差异较大的株系,评价

株系内不育临界温度的遗传稳定性, 至第6代决选基本稳定的株系各1个。各代选择中注意保持各株系间不育最低温度特性差异, 同时保持其它性状的相同, 目前已繁殖10代并进行第9代的育性稳定性鉴定。

## 2 结果与分析

**2.1 供试培矮64S-5混合群体的育性分离状况** 不同温度下对培矮64S-5进行单株育性鉴定的花粉育性结果如表1。较低温度(24℃)条件下, 培矮64S-5混合群体的单株之间育性差异明显, 其花粉可染率变化范围为0.00%~27.00%, 随处理温度升高可育株数减少, 在26℃时只有极小比例低可育株, 在较高温度(28℃)下各单株才表现育性的一致性, 群体才能达到全不育水平。说明供试材料的平均不育临界温度已达26℃或以上, 远高于该不育系通过鉴定时的24℃不育临界温度值<sup>[4]</sup>, 已属不合格不育系。在24℃下仍有较大比例完全不育株, 表明群体的不育临界温度的升高在单株间不是均一变化的, 同时, 在某一较低温度下表现可育的单株在另一较高温度下仍能表现不育, 所有的“可育株”中没有出现常规可育株, 说明它们仍保持育性转换的基本特性, 单株间的这种育性差异仅是不育起点温度的不同。当温度为26℃或以上时, 基本达到实用要求, 表现群体不育。

表1 不同温度下培矮64S-5混合群体的单株育性组成\* (1995年)  
Table 1 The fertility classification of Peian64S-5 plants under different temperature conditions(1995)

温度 (℃) Temp.	花粉碘染率 Pollen fertility (%)					群体平均 可染花粉 Mean pollen fertility (%)	群体平均 结实率 Mean seed set %
	0.00	0.10~0.50	0.50~5.00	5.00~20.00	>20.00		
24	59**	77	80	22	3	9.18	2.58
25	112	88	36	5	0	3.22	1.46
26	226	12	3	0	0	0.37	0.12
28	238	3	0	0	0	0.12	0.00

\* 总株数为241株 \* The sum plant is 241; \*\* 单株数 \*\* Plant numbers

**2.2 不育临界温度性状的选择效果** 在24℃下选择出的完全不育株繁殖种子按株单收并将稻菀保存过冬, 次年对再生苗群体和后代种子苗组成的新群体进行育性鉴定, 结果见表2。不育株后代新群体表现为群体低温不育, 基本达到亲本不育株无性后代的育性水平, 再生不育株在低温鉴定中又有少数株表现低度可育, 可能是前次鉴定中的误选或两次鉴定条件或植株生长状况差异所致, 而不育株自交后代中出现的低度可育株来源则可能还与遗传分离有关。但就鉴定群体来说其纯度已达不育系利用所要求的标准。本结果证明低不育临界温度特性能遗传到下代, 对低不育临界温度性状的选择是有效的, 同时也说明一次低温选择不够。

表2 中选低温不育株自交后代在24℃下的育性鉴定(1996年)  
Table 2 The spikelet fertility of the offspring plants of low temperature sterile plants in 24℃ phytotron (1996)

材料 Plants	鉴定株数 Number of tested plants	不育株数 Number of sterile plants	可育株数 Number of fertile plants	可育株平均结实率 Mean seed set of fertile plants(%)	群体平均结实率 Mean seed set of all tested plants(%)
低温不育株再生稻 Parents plants	40	36	4	1.22	0.12
低温不育株自交后代 Offspring plants	94	81	13	1.85	0.28

**2.3 各不同株系后代的不育临界温度性状稳定过程** 将表2中, 24 下中选的不育株再进行23 处理, 选出23 下的不育株, 记为 P2364S, 其余不育株记为 P2464S; 依表1中不同温度下的育性结果分别确定26 下不育的单株记为 P2664S; 28 下的不育单株记为 P2864S。这些中选单株具有不同的不育起点温度特性。依株型、生育期和各农艺细微特征相同的原則, 各选其中5~ 8株作为核心单株, 无性繁殖保存, 同时自交繁殖第1代种子。按系谱法选择程序进行后代不同温度下育性鉴定, 直至不育临界温度性状不发生分离, 第6代各决选其中1个株系进行下一轮鉴定。表3列出了各株系部分世代在4种温度下的不育性动态变化情况。

表3 各不同临界温度的株系后代在不同温度下的不育株分布(1995~ 1998年)

Table 3 Number of sterile plant of 4 lines at different generates in a series temperature treatments(1995~ 1998)

材料 Lines	世代数/总株数 No. of generate/ Total plants	自然高温(30.5 °C)					In natural high temperature
		23	24	26	28		
P2364S	1	40	35	38	40	40	40
	2	40	37	39	40	40	40
	3	40	39	40	40	40	40
	4	40	40	40	40	40	40
	5	40	40	40	40	40	40
	6	80	80	80	80	80	40
P2464S	1	40	6	28	35	39	40
	2	40	2	34	38	40	40
	4	40	0	39	40	40	40
	6	80	0	80	80	80	40
P2664S	2	60	0	4	42	55	60
	4	60	0	1	58	60	60
	6	80	0	0	79	80	60
P2864S	2	60	0	0	7	53	60
	4	60	0	0	1	59	60
	6	80	0	0	1	79	60

从表3可以看出各株系经多代温度定向选择, 其不育株分布逐代向所选定的临界温度集中, P2364S 在第3代已基本稳定, 在第4代后群体已完全在23 不育。其它株系在第4代时已基本稳定。

**2.4 各株系间的不育性、自交繁殖可育性及生育期特性比较** 4个株系在23.5 下各80株的平均花粉育性、1998年海南陵水繁殖自交结实率、自然条件下在武昌5月10日播种的播种至始穗历期数据列于表4。23.5 下各株系花粉育性差异明显, P2364S 处于其不育临界温度以上的温度条件下,

表现完全败育, 其它3个株系因环境温度低于其不育临界温度则表现不同程度可育, 其中 P2864S 表现较高可育。4个株系株系内标准差都极小。在陵水短日可育温度条件下, 4个株系的自交结实性差异也大, 不育临界温度低 P2364S 的结实性对温度反应敏感, 而临界温度高的材料结实性受温度影响相对较弱, 结实性高低也反映出各株系的不育临界温度差异特性。各材料在自然条件下的生育期相同, 其它性状也无异同, 4份材料只存在育性对温度反应的差异。

表4 各株系育性和生育期特性比较(1997~ 1998年)

Table 4 The sterility, fertility and days from sowing to earing of 4 lines in different conditions (1997~ 1998)

株系 Lines	23.5	海南繁殖	播始历期(天)
	花粉败育度(%) Pollen sterility in 23.5	结实率(%) Seed set % in Hainan	Days of sowing to earring
P2364S	100.00 ± 0.00	36.54	84
P2464S	97.72 ± 0.86	38.68	84
P2664S	89.22 ± 1.59	45.65	83
P2864S	68.54 ± 3.42	58.28	83

### 3 讨论

**3.1 培矮64S 的不育临界温度上升的原因** 本研究表明, 不育临界温度已升高的培矮64S 混合群体中仍存在较大比例的低不育临界温度单株, 不育临界温度上升只是群体平均值的上升, 单株间不是均一同步变化的, 实持上是单株间不育临界温度性状的分离。对临界温度性状的选择有效又说明该性状是能遗传的。故可推测: 原不育系的基因型存在杂合性或单株间存在遗传异质性。这种不育系在自交(近交)后代中发生遗传重组产生了不同的新的基因型单株。但这些不同的基因型之间在遗传背景上高度一致, 农艺性状及其它表型也一致, 只在不育临界温度性状上存在一定差异, 其高世代自交(近交)群体就是由这些不同基因型组成的混系。混系群体内不同的单株间再近交重组, 加上在不育系繁殖中, 临界温度高的单株繁殖系数高, 这种遗传重组与自然选择加速了不育系群体水平上的不育临界温度的较大差异。

**3.2 不育临界温度不同的培矮64S 近等基因系选育的意义** 经10代连续定向温度选择和农艺性状选择, 培矮64S 中这套不育株系在农艺性状、生育期和育性临界温度特性上已稳定。它们来自同一不育系培矮64S 的高世代株系培矮64S-5的后代, 除了控制不育临界温度的遗传因子外, 遗传背景基本相同, 故可将它们视为具有不同临界温度特性的近等基因系或等基因系。

这套近等基因系间育性温度反应特性差异明显, 但仍属于具有明显育性转换特性的光温互作型不育系<sup>[6, 7]</sup>, 在长光照、28℃以上均可表现完全败育。它们的主效不育基因来源于农垦58S 的光敏核不育基因, 但控制主效不育基因完全表达所需温度条件的遗传因子存在差异。因此, 在光、温敏核不育系选育中, 不仅要首先对主效光、温敏不育基因控制的育性转换特性进行鉴定与选择, 还要对控制临界温度高低的遗传因子进行选择, 获得基因型纯合的低不育临界温度不育株系, 才能保证其自交后代的遗传稳定性与不育性稳定性。

研究不育临界温度高、低的遗传组成对指导低起点温度不育系选育是重要的, 本套近等基因系为不育系不育临界温度差异的遗传机理研究提供了独特的材料, 可消除在研究中因遗传背景差异产生的干扰。利用这套材料可用常规遗传学研究方法分析不育临界温度高低的遗传组成和方式, 进而进行它们之间的DNA、RNA 分子差异或生理生化差异标记用于建立低不育临界温度性状的辅助选择技术, 还可研究雄性不育基因表达的遗传控制机理。

近等不育系中的P2364S 是一份已稳定的低不育临界温度不育系, 其配合力等综合性状与原培矮64S 无异, 具有实用价值, 可作为核心种子替代生产上现有的培矮64S, 直接应用于两系杂交稻生产。

### 参 考 文 献

- 1 张自国, 卢兴桂, 袁隆平. 杂交水稻, 1992, (6): 29~ 32
- 2 卢兴桂. 高技术通讯, 1992, (5): 1~ 4
- 3 袁隆平. 杂交水稻, 1994, (6): 1~ 3
- 4 白德朗, 罗孝和. 湖南农业科学, 1995, (6): 6~ 8
- 5 袁隆平, 李继明. 湖南农业科学, 1995, (6): 4~ 5
- 6 曾汉来, 张自国, 卢兴桂等. 华中农业大学学报, 1995, 14(2): 105~ 110
- 7 曾汉来, 张端品, 张自国等. 作物学报, 1997, 23(6): 693~ 698