

红莲型细胞质雄性不育的发现利用研究及展望

胡骏*, 朱仁山, 李绍清, 李阳生, 余金洪, 黄文超, 朱英国*

武汉大学生命科学学院, 杂交水稻国家重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: junhu@whu.edu.cn; zhuyg@whu.edu.cn

2016-10-02 收稿, 2016-10-08 修回, 2016-10-09 接受, 2016-11-24 网络版发表

国家自然科学基金(31371698, 31670310)和湖北省农业厅项目(2015BBA149)资助

摘要 自杂交水稻研究50年来, 红莲型杂交水稻采取基础研究、应用研究、产业化相结合的模式为杂交水稻事业的发展做出重要贡献. 红莲型细胞质雄性不育基因 $orfH79$ 位于线粒体基因 $atp6$ 下游, 编码79个氨基酸, 具细胞毒性, 与电子传递链复合体Ⅲ的蛋白亚基互作, 机理研究结果表明这种互作可能引起ROS的上升而导致花粉败育. 对两个育性恢复基因 $Rf5$, $Rf6$ 的研究结果表明, 这两个PPR基因均不能与不育基因转录本直接互作, 其中 $RF5$ 与 $GRP162$ 及 $RFC3$ 等蛋白互作, 以蛋白复合体的形式加工不育基因转录本, 而 $RF6$ 与 $HXK6$ 互作, 形成新的蛋白复合体, 二者育性恢复通路各自独立. 以不育基因 $orfH79$ 为分子标记, 创制出一批新的红莲型细胞质不育系; 以恢复基因 $Rf5$, $Rf6$ 为分子标记, 筛选出一批双恢复基因强恢复系, 选育出高产优质多抗广适红莲型杂交水稻新组合红莲优6, 粤优938和珞优8号等. 红莲型杂交稻在中国长江流域、华南稻区大面积推广种植, 同时在越南、印度尼西亚、马来西亚、孟加拉和菲律宾等东南亚国家引种推广并表现优异, 展现出广阔的应用前景.

关键词 杂交水稻, 红莲型, 细胞质雄性不育, 育性恢复, 种质创新

粮食事关国运民生, 是人民生活的基本要素, 国民经济的重要支柱, 国家安全的重要基础. 粮食安全既是经济问题, 也是政治问题, 是国家发展的“定海神针”^[1]. 稻米是我国13亿人口的主粮, 是关乎国计民生的重要物质. 杂交水稻被誉为“第二次绿色革命”, 使得水稻产量得以大幅提升^[2]. 雄性不育株的发现和利用是杂交水稻的重要基础, 因此, 雄性不育多样性是保障杂交水稻种质多样性的有效途径, 防止种质单一性而带来的生产风险^[3]. 自20世纪70年代, 袁隆平、李必湖、冯克珊等人在海南南红农场发现野败型雄性不育材料后, 全国水稻工作者利用不同技术方法开始探索新不育系的挖掘和创制^[4]. 据不完全统计, 目前已经成功应用的细胞质雄性不育系材料超过20余种. 武汉大学在细胞质多样性创制方面做出了重要贡献, 先后培育出马协型、红莲型等多

种细胞质不育新类型, 并实现了三系配套. 通过40年来的不懈研究, 红莲型杂交水稻在基础研究、应用研究和产业化等方面均有突破, 形成了特色, 本文回顾了红莲型细胞质的发现及其研究历史, 展望了红莲型杂交水稻的未来发展, 期望能为其他农作物的种质创新及研究应用提供借鉴.

1 红莲型细胞质的发现

远缘亲本核置换是培育植物雄性不育的重要途径之一^[5], 武汉大学生物系遗传研究室朱英国教授等人于1972年利用红芒野生稻为母本与多个栽培品种进行杂交回交, 其中在以江西地方品种莲塘早父本杂交的后代中发现了雄性不育株, 并经过多次选择回交, 获得了不育性稳定的 BC_4F_2 材料, 各取两个亲本的第一个字, 命名为红莲型细胞质雄性不育系

引用格式: 胡骏, 朱仁山, 李绍清, 等. 红莲型细胞质雄性不育的发现利用研究及展望. 科学通报, 2016, 61: 3813–3821

Hu J, Zhu R S, Li S Q, et al. Discovery, utilization and perspective of Honglian cytoplasmic male sterile rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 3813–3821, doi: 10.1360/N972016-01094

(Honglian-type cytoplasmic male sterility, HL-CMS)^[6]. 进一步通过大量杂交转育, 相继转育出红莲华矮15A, 中锋1A, 1024A, B杂金A和泰引1A等多个不育系并实现了三系配套. 20世纪80年代分别转育成红莲型青四矮2号A及丛广41A, 20世纪90年代通过集成育种技术培育出粤泰A, 超泰A, 珞红3A, 珞红4A等多个优质抗虫不育系, 系谱关系如图1所示.

红莲型不育系与其他类型不育系相比有很大不同,细胞学观察表明不育系花粉败育特征为圆败^[6],败育时期属于二核期.遗传学研究表明,红莲型属于配子体不育类型^[7],与单核期花粉败育的野败型水稻不同,恢保关系与野败完全不同,恢复谱也比野败型较之广泛,因此红莲型细胞质是杂交水稻新胞质.

2 红莲型杂交水稻的育性研究

杂交水稻的发展基础是雄性不育系和恢复系。研究细胞质雄性不育及育性恢复的遗传学、细胞学和分子机制,克隆分离不育基因和育性恢复基因,不仅有助于创造新的雄性不育资源,提高杂种优势利用效率,而且有助于揭示水稻杂种优势的形成机理。武汉大学利用红莲型杂交水稻的这一套系统通过细胞学、遗传学、分子生物学的研究,克隆了细胞质雄性不育基因 $orfH79$,育性恢复基因 $Rf5$ 和 $Rf6$,初步解析了雄性不育和杂交稻育性恢复的分子机理。

2.1 红莲型杂交水稻不育基因的 $orfH79$ 的克隆及研究

(i) 不育基因*orfH79*的克隆与功能互补. 大量研究表明, CMS的雄性不育基因是由线粒体基因组

编码的一个短肽或蛋白。为克隆HL-CMS不育基因,本课题组构建了红莲型不育系粤泰A(YTA)与相应保持系粤泰B(YTB)线粒体基因组BAC文库。以线粒体基因 $atp6$ 为探针筛选文库并对阳性克隆测序,发现在YTA线粒体基因组 $atp6$ 基因下游200 bp处存在一个新的可读框(open reading frame, ORF), 编码79个氨基酸, 定名为 $orfH79$ ^[8]。研究表明, 在HL-CMS不育系中, $orfH79$ 有两种转录产物, 一种是与 $atp6$ 基因共转录为2.0 kb的分子, 定名 $atp6-orfH79$; 另一种是独立转录的约0.5 kb的分子, 定名为 $orfH79(s)$, 而BT-CMS中仅有2.0 kb $atp6-orfH79$ 的转录本。进一步研究表明, 这两个转录本均能翻译成ORFH79。将 $orfH79$ 融合一段线粒体导肽进行转基因互补验证, 结果表明转基因植株中ORFH79进入线粒体后, 可造成配子体雄性不育, 败育特征为圆败, 与红莲型不育系表型一致, 并在 T_1 子代中稳定遗传, 因此 $orfH79$ 是红莲型细胞质雄性不育基因^[9]。

(ii) 红莲型细胞质雄性不育的机理研究. 生物通过线粒体遗传方式控制雄性不育, 增加获得外来遗传物质的机率, 是长期进化的选择. 迄今为止, 研究者们发现并克隆了超过17个与CMS相关的不育基因, 然而关于植物CMS的机理仍不是十分清楚^[7]. 研究者们聚焦线粒体, 从形态与功能等方面深入剖析, 基于已有的对CMS研究的实验事实, 提出了两种假说: 一种是毒性假说, 认为CMS基因的产物能与特定组织的未知化合物如绒毡层产生的未知因子“X”相互作用, 最终引起小孢子败育^[10]; 另一种是能量假说, 认为CMS基因的产物以某种方式干扰了正常线粒体的生理功能, 在雄配子发生过程中线粒体代

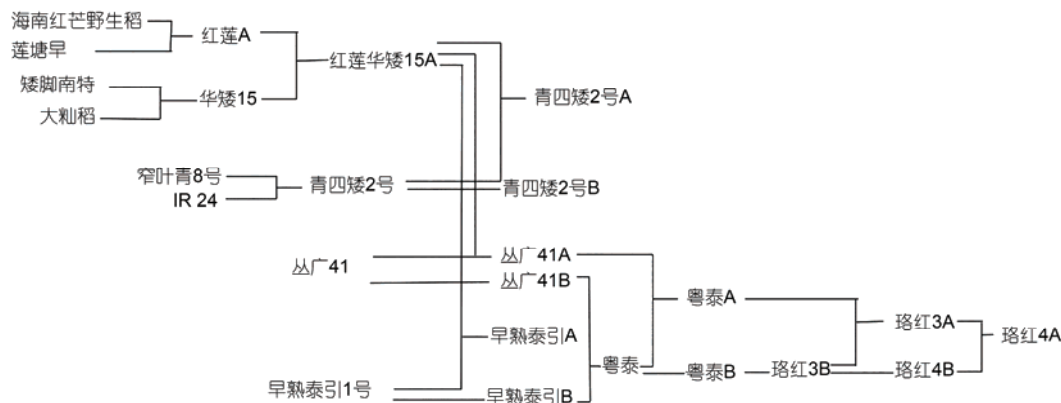


图 1 红莲型细胞质雄性不育系的系谱图
Figure 1 Honglian type male sterile rice family tree

谢失常是引起花粉败育的主要原因^[11]。尽管这个假说能解释在植物CMS中观察到的花粉发育程序受阻伴随着小孢子及绒毡层中线粒体崩解等异常现象^[12,13]，但并不能解释为什么CMS植物生长发育中其他发育阶段并不受到影响的事实。

以红莲型不育系YTA为材料，研究发现不育系花药小孢子在减数分裂期开始出现细胞程序性凋亡信号，四分体时期出现明显的DNA片段化。进一步研究表明，四分体时期以前线粒体内即已具有明显的氧化胁迫信号，线粒体内氧自由基含量显著上升，线粒体内膜透势迅速下降，SOD, APX, CAT等抗氧化系统酶活性显著下降，说明红莲型细胞质雄性不育系小孢子的发育过程提前发生细胞程序性死亡过程^[14,15]。结合双向电泳，ICAT (isotope-coded affinity tag)，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight/mass spectrometry, MALDI-TOF/MS)，LC-MS/MS (Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry)等蛋白质组学技术，分析了红莲型水稻不育系、保持系及杂种F₁的花药蛋白表达，发现大量涉及物质能量代谢、细胞周期、转录、物质转运等功能蛋白的缺失或下调^[16,17]。最新研究表明，通过酵母双杂交、BiFC、免疫共沉淀等方法，证明ORFH79与线粒体电子传递链复合体Ⅲ的一个亚基P61之间有互作，这种互作干扰了复合体Ⅲ的生物学活性，从而导致ROS上升和ATP能量下降，上述研究证据支持能量假说，表明花粉败育与能量不足有较强联系^[18]。另一方面，研究发现当在细菌和酵母中表达ORFH79蛋白时，ORFH79严重影响细菌和酵母菌的正常生长，表明ORFH79是一个毒性蛋白，这与ORF79的结果较为相似^[19]。同时，BN-PAGE结合MS及Western Blot的结果表明ORFH79广泛分布在400~1200 kD的蛋白复合体区域，暗示可能ORFH79自我组装形成膜通道蛋白，造成膜电势的泄漏^[20]。这一研究与油菜Ogura-CMS不育蛋白ORF138结果相类似，这些研究结果又偏向支持毒性假说^[21]。到底是毒性伤害导致能量不足，还是能量匮乏产生细胞毒性，还需更多的分子实验证据。值得注意的是，植物CMS主要分为孢子体CMS和配子体CMS两大类，上述两种假说并不涉及对孢子体细胞质雄性不育与配子体细胞质雄性不育机理的探讨，而事实上这两种细胞质雄性不育的败育机理并不相同，因此我们仍似盲人摸象般，并未真

正阐明细胞质雄性不育的起源及生物学分子机理。

2.2 红莲型杂交水稻育性恢复基因的Rf5的克隆及研究

与两系杂交水稻相比，三系杂交水稻具有真正意义上的恢复基因，两系杂交水稻的“恢复基因”事实上只是不育基因的等位基因互补，而三系杂交水稻的恢复基因必须通过对不育基因进行加工才能达到育性恢复的功能。目前已克隆的CMS育性恢复基因已有10余个，其中红莲型杂交水稻两个Rf5和Rf6^[7]。

(i) Rf5的定位、克隆及功能互补。Rf5首先发现在恢复系密阳23中，利用杂交回交获得Rf5近等基因系，构建回交群体，将Rf5定位于SSR标记RM6469和RM25659之间，通过筛选密阳23的BAC文库获得候选克隆并进行亚克隆测序，将可能的候选基因分别进行转基因互补，结果表明仅PPR791能恢复YTA的育性，且T₁群体呈1:1配子体分离模式遗传。Rf5是一个编码791个氨基酸的PPR基因，各组织均有表达，细胞学定位显示蛋白质定位于线粒体中，与BT-CMS的Rf1 (Rf1a, PPR791)是同一个基因^[22]。在杂种F₁中，不育基因转录本无论是2.0 kb的*atp6-orfH79*还是0.5kb的*orfH79(s)*均被剪切成更小的片段，从而无法翻译，达到育性恢复，如图2。

(ii) RF5的育性恢复机理研究。恢复基因如何对不育基因转录本进行加工是阐明育性恢复机理的重要科学问题，然而大量实验证明RF5并不能直接与*atp6-orfH79*互作，因此本课题组通过酵母双杂交，BiFC (bimolecular fluorescence complementation)，Pull-down、免疫共沉淀等生化技术手段，获得了RF5的互作蛋白多个，其中甘氨酸富集蛋白(glycine rich protein, GRP162)具有RNA结合结构域，可以与不育基因转录本*atp6-orfH79*特异性结合。BN-PAGE及SEC等分析，发现RF5与GRP162在一个400~500 kD大小的蛋白复合体中，命名为恢复基因复合体(restoration of fertility complex, RFC)。GRP162可形成二聚体，这与GRP162与不育转录本有两个结合位点结果相一致^[23]。最新研究发现一个新的亚基(RFC subunit 3, RFC3)，该亚基具有跨膜结构，C端与RF5互作，而N端与GRP162互作，在转基因干涉的材料中，特异的在红莲型杂交水稻中产生配子体雄性不育，进一步机理研究表明RFC的大小发生变化，因

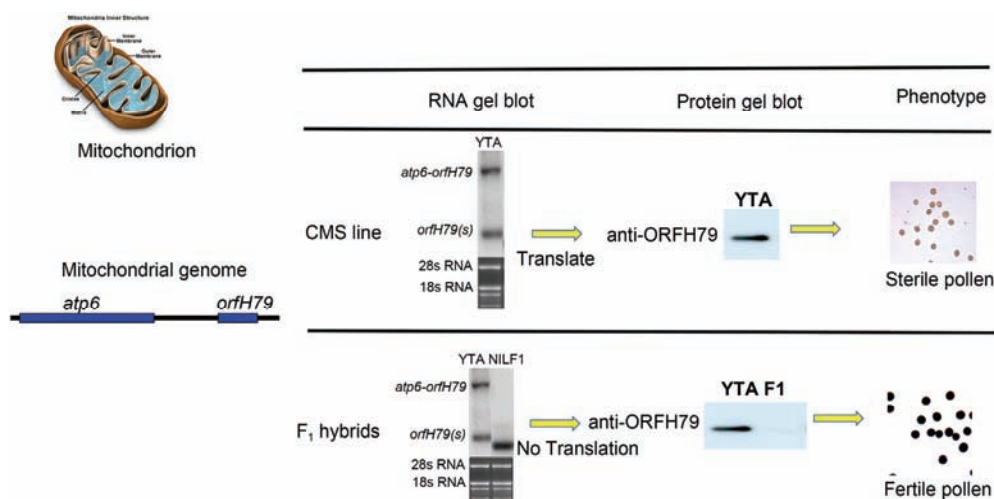


图2 (网络版彩色)红莲型细胞质雄性不育与育性恢复

Figure 2 (Color online) Male sterility and restoration of fertility in Honglian CMS rice

此,我们推断该基因参与了RFC的组装^[24].

综上所述,我们发现红莲型杂交水稻育性恢复是通过一个蛋白复合体完成的,其中RF5发挥了招募的功能、GRP162形成二聚体结合不育基因转录本、RFC3负责蛋白复合体的各亚基之间的正确组装.由于RFC大小约在400~500 kD之间,因此还有其他蛋白亚基尚未揭示,那么这些亚基如何参与育性恢复并发挥了什么生物学功能仍在研究之中.

2.3 红莲型杂交水稻育性恢复基因的Rf6的克隆及研究

(i) Rf6的定位、克隆及功能互补. 9311及其衍生系是国内目前应用最为广泛的恢复系之一. 遗传研究表明, 9311具有两个不等位恢复基因, 除去位于第10号染色体的Rf5外, 第8号染色体存在另一个恢复力相当的恢复基因, 命名为Rf6^[25]. 通过构建19355株F₂群体, 及554株BC₁F₁群体, 将Rf6精细定位于第8号染色体的RM3710~RM22242间. 通过不育系与恢复系之间的比较, 发现该区段的1个PPR基因在不育系中缺失了一段重复序列, 由此开发出共分离分子标记ID200-1. 9311中该基因全长2685 bp, 编码894个氨基酸, 命名为PPR894, YTA中的rf6仅786个氨基酸. 转基因互补实验证明, PPR894能恢复红莲型不育系YTA的育性, 并在转基因后代中按配子体模式遗传. RF6同样定位于线粒体中, 这与不育基因产物存在于线粒体中相吻合^[25].

(ii) RF6的育性恢复机理研究. RF6的机理研究同样表明RF6不能与不育基因转录本直接互动, 通过酵母双杂交文库淘洗, 并Pull-down验证, 获得了RF6的特异互作蛋白hexokinase 6 (HXK6), HXK6的转基因干涉植株也表现出配体子模式雄性不育, 同时不育基因转录本atp6-orfH79的加工也被破坏^[25]. 研究表明, RF6与RF5的互作蛋白之间并没有相互作用, 因此推断RF6以另一个蛋白复合体的方式加工不育基因转录本而达到育性恢复, 深入的分子机理研究仍在进行之中.

3 红莲型杂交水稻品种选育及产业化

品种选育是一门科学也是一门艺术, 红莲型杂交水稻的“矮化育种、集成育种、分子标记辅助育种”育种之路恰是当前杂交水稻品种选育的发展之路, 并形成了高产、优质、广适、多抗的多重优点, 适应了杂交水稻发展的新需求.

3.1 矮化育种

起初红莲型不育材料来自于红芒野生稻与莲塘早的杂交材料, 虽然育性表现良好, 但秆高易倒伏, 在生产上不能使用, 随着第一次绿色革命“矮化育种”的到来, 课题组利用矮秆材料矮脚南特与大籼稻的后代华矮15为亲本, 成功转育成红莲型矮秆不育系红莲华矮15A, 青四矮2号A等多个不育系并成功的实现了三系配套^[26].

3.2 集成育种

解决了育性和矮秆的问题后,红莲型杂交水稻的育种工作将优质、高产放在了重要位置.研究人员收集国内外大量种质资源,进行产量、开花习性、米质和配合力等综合性状评价,采取集成育种的技术,全面系统地提高红莲型杂交水稻的特性^[26].广东农业科学院利用广东优质种质资源与红莲型胞质杂交,选育出优质不育系粤泰A,开花习性好,制种产量高.进一步配组培育出红莲优6、粤优938等多个新品种并通过审定.其中红莲优6是湖北省第一个优质杂交中稻,累计推广面积超过5000万亩.

利用辐射处理红莲型保持系粤泰B,在其变异后代群体中选择早熟单株,同时在低氮低肥的条件下进行性状集成选育,选育出新型红莲不育系珞红3A,不仅保持了原有良好的开花习性,而且缩短了生育期,降低了株高,同时耐低肥形成了氮肥高效利用的特性.利用不育系珞红3A为母本,与红莲型恢复系R8108测配选育而成的超级稻珞优8号被农业部正式认定为超级稻,为湖北省第一个超级稻中稻品种,累计推广面积超过4000万亩,为农民带来了显著的经济效益.

3.3 分子标记辅助育种

随着现代分子生物学的发展和不断进步,育种技术不断提高和创新.杂交水稻育种技术已进入常规技术与生物技术紧密结合的分子育种技术的新时代,杂交水稻育种发展趋势正逐步由表型选择向基因型选择、由形态特征选择向生理特征选择、由随机选择向定向选择、由单一抗性的聚合育种的大转变.目前,分子标记辅助选择育种是水稻分子育种的支撑技术之一,已经成为作为育种的重要技术途径.研究人员利用基础研究获得的研究成果以及分子标记技术改造提升红莲型杂交水稻的新特性,从而加速育种进程,提高育种效率,选育抗病、优质、高产的新品种,如图3所示.

(i) 分子标记辅助选择筛选新不育系和恢复系.以克隆的红莲型细胞质雄性不育基因 $orfH79$,育性恢复基因 $Rf5$ 和 $Rf6$ 为分子标记,在野生稻和农家品种中进行种质资源的筛选,更快、更有效地定向选择出红莲型细胞质不育系和及恢复系资源,有利于种质资源的挖掘和创新.目前已获得多个含有 $orfH79$ 的野生稻资源,并利用粤泰B杂交多代回交创造了4种新的雄性不育系,即w15A, w20A, w34A, w46A^[27].

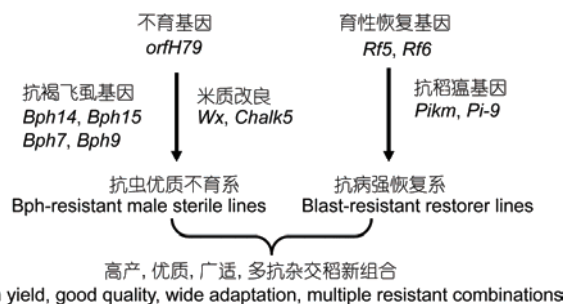


图3 红莲型杂交水稻选育策略

Figure 3 Breeding strategy of Honglian type hybrid rice

利用 $Rf5$, $Rf6$ 获得了多个聚合双恢复基因的强恢复系,比单恢复基因的恢复系具有更好的配合力,杂种一代表现出75%的可育花粉,对非生物胁迫逆境有更强的抵御能力,如耐高温、低温等,生产上表现出稳产性好,适应性广^[28].

(ii) 优异抗性基因的聚合.病虫害是影响水稻产量的主要因素之一,因此抗病抗虫也是杂交水稻的重点研究方向之一.本课题组利用抗褐飞虱 $Bph14$, $Bph15$ 的共分离分子标记,定向选择含有抗褐飞虱基因的材料,同时也将这些材料在苗圃中喂食褐飞虱,最终选育出高抗褐飞虱的材料^[29,30].目前已经获得了高抗褐飞虱的保持系珞红4B,经过多代回交培育出高抗褐飞虱的红莲型不育系珞红4A^[31],由珞红4A配组的新组合珞优9348等具有抗褐飞虱特性.为保证抗褐飞虱的多样性,课题组继续以 $Bph7$, $Bph9$ 的共分离分子标记,定向选择新的抗褐飞虱材料.在抗稻瘟病新品种培育的过程中,本课题组利用 $Pi9$ 等优良广谱抗性基因的分子标记进行定性选择,同时也在崇阳、宜昌、恩施等稻瘟病高发地区进行田间自然筛选,实现实验室与田间的一致性.

(iii) 优质米新品种的分子选择.高产与优质在杂交水稻的品种选育中往往难以统一.近些年,随着生活水平的提高,人们对优质米的结构需求越来越高.本课题组着手利用 $Chalk5$, Wx 等米质相关的基因进行红莲型杂交水稻的优质米新品种选育,从保持系与恢复系入手,分子标记辅助选择育种与常规育种相结合,选育新的优异材料.

(iv) 野生稻新质源的创制和利用.以药用野生稻、长药野生稻、非洲野生稻等优异野生稻资源与栽培稻9311杂交构建重组自交系,并评价和鉴定这些重组自交系,进一步克隆并分离新的抗病、抗虫等优异抗性基因^[32].为培育强优势的高产、优质、多抗、

广适性红莲型杂交稻创制种质资源, 保证杂交水稻的可持续性发展。

3.4 红莲型杂交水稻的产业发展

与其他类型杂交稻相比, 红莲型杂交稻具有5个明显特点: (1) 米质优, 口感好. 红莲优6号、粤优938和珞优8号均达到优质米标准. (2) 产量高. 红莲型杂交稻组合大面积生产平均亩产一般达650~700 kg. (3) 开花习性好, 异交率高, 繁育、制种产量高. 制种产量一般亩产225~250 kg左右, 高产的达到350 kg以上. (4) 适应性广, 适合在长江流域、华南、西南种植, 同时在东南亚地区也可种植. (5) 耐高温性能较强, 在江汉平原等局部地区盛夏的高温炎热天气, 红莲型杂交稻可保持较高结实率, 高产稳产. 当前, 红莲型杂交水稻在中国长江中下游、华南稻区已大面积种植, 在越南、印度尼西亚、马来西亚、孟加拉和菲律宾等东南亚国家也表现优异, 展现出广阔的应用前景, 是我国杂交水稻种子出口的重要组成部分^[26].

4 红莲型杂交稻发展展望

4.1 红莲型细胞质的利用

除了在杂交籼稻中已经成功利用外, 红莲型细胞质也在杂交粳稻得以开花结果. 我国粳稻种植面积超过1.2亿亩, 而杂交粳稻仅占粳稻6%不到. 目前应用三大细胞质类型中, 野败型籼稻不育系在转育成粳稻不育系后, 恢复系少而无法利用; 包台型粳稻不育系花粉败育时期较晚, 不育性较差, 容易自交结实, 种子生产风险大. 而红莲型不育系花粉二核期败育, 介于野败型与包台型之间. 与野败型相比, 其可恢复性和开花习性均优于野败型, 且各个基因均已克隆可自由定向选择; 相对于包台型, 红莲型粳稻不育系不育性更加稳定, 生产风险小, 繁殖、制种产量高^[33]. 因此, 红莲型细胞质能更有效地应用于粳型杂交稻, 为促进我国1.2亿亩粳稻的杂种优势利用找到了一条切实可行的新道路.

从“甬优”系列杂交稻的高产潜力来看, 籼粳交的杂种优势利用是未来方向之一, 但仍需解决不育系的开花习性、不育性、配合力等问题. 红莲型杂交稻的三个基因, 不育基因*orfH79*, 恢复基因*Rf5*和*Rf6*均已克隆, 实现了杂交水稻的“由必然走向自由”的基因配套, 可利用这3个基因创制出更多的不育系与恢复系,

并从“籼(稻)不(育系)粳(稻)恢(复系)”的道路出发, 实现杂交水稻自由组配, 选育出强优势籼粳交组合.

4.2 杂种优势机理的研究与利用

细胞质雄性不育与育性恢复是研究杂种优势的优异材料, 通过遗传学、细胞学、表观组学、转录组学、蛋白组学及代谢组学等多种现代生物学技术, 分析两套不同的遗传信息如何在子代中产生优势性状, 解析杂种优势网络调控, 为获得杂种优势位点或区段奠定基础. 广泛收集水稻生态优势群的代表性种质资源, 进一步开展水稻优势群的研究, 利用不同优势群进行杂交配组, 解析各优势群之间杂种优势的形成机理, 并在生产实践上加以利用.

以杂交水稻国家重点实验室为平台, 以长江流域杂交水稻协同创新中心为支撑, 联合国内多个优势单位, 进一步加强红莲型杂交水稻的理论研究与品种选育, 扩大种质资源利用范围与途径. 在产量、米质、抗性、适应性等方面不断突破.

4.3 杂交水稻发展新趋势

随着劳动力成本上升、农业从业人员锐减、农村不断城镇化等社会发展, 农业产业结构已发生重大变化, 而我国水稻品种改良长期以追求高产为目标, 导致出现了水稻品质整体较差、抗性较差、机械化程度低、氮肥利用率低等诸多弊端. 当前化肥农药施用量惊人, 对我国土壤和环境造成极大的污染, 大大地降低土壤的肥力水平.

因此杂交水稻发展方向更加多样化, 高产、优质、广适、高效、多抗是新的趋势, 高产是指保持杂交水稻产量在较高的水平上稳产, 具有较高的耐高温、耐低温的特性; 优质是指稻米品质进入国标优质米行列, 改善人民生活水平需求, 适应稻米结构性需求的变化; 广适是指广泛的生态适应性, 在主要的稻作区均能保持较高的产量水平; 高效是指具有较高的氮肥利用率, 减少化肥的使用, 减少环境污染; 多抗是指杂交水稻综合了较高的抗性水平, 能抵御主要病虫害, 减少农药的使用, 保证产量, 减少环境污染. 此外, 应将规模化、机械化和信息化相结合, 选育适合大规模机械化操作的新品种.

4.4 面向国际、走向未来

中国是世界上最大的杂交水稻种子生产国和消

费国, 国际上有30多个国家和地区在研究、试种和推广杂交水稻, 主要集中在东南亚、非洲等地, 这些地区的人口增长幅度大, 粮食安全问题严峻. 对这些地区和国家来说, 杂交水稻是切实可行的一条解决粮食安全之路, 因此杂交稻种国际市场上需求量巨大, 仅东南亚地区年需求量就近4万吨. 目前, 红莲型杂交稻已逐步打开国外市场, 在越南、老挝、孟加

拉、非洲几内亚等国家种植, 表现优异, 已得到较好反响, 并引起当地政府的高度重视, 当前杂交水稻中出口主要为II优系列和红莲型系列杂交稻. 红莲型杂交稻已成为杂交稻种子出口的主力军后, 应继续加强实地指导, 完善杂交水稻当地配套服务, 既为解决当地粮食安全做出贡献, 也为国家种子出口创造效益.

致谢 感谢参与红莲型杂交水稻研究的学生们以及为红莲型杂交水稻推广和应用做出巨大贡献的企业、技术员及广大农民.

参考文献

- 1 Ren Z X. Food security is always the top priority in governing—thoroughly studying and applying the important discussion about food security of president Xi Jinping (in Chinese). *Qiushi*, 2015, (10): 13–16 [任正晓. 解决好吃饭问题始终是治国理政的头等大事——深入学习贯彻习近平总书记关于粮食安全的重要论述. *求是*, 2015, (10): 13–16]
- 2 Wu Z X. The heritability theory of heterosis and its meaning for global agriculture. *Acta Genet Sin*, 2003, 30: 193–200
- 3 Hu J, Huang W C, Zhu R S, et al. Male sterility and utilization of heterosis in rice (in Chinese). *J Wuhan Univ (Nat Sci Ed)*, 2013, 59: 1–9 [胡骏, 黄文超, 朱仁山, 等. 水稻雄性不育与杂种优势的利用. *武汉大学学报(理学版)*, 2013, 59: 1–9]
- 4 Yuan L P. Process of wide-abortive type three line male sterile rice (in Chinese). *National Rice Research Meeting*, 1973 [袁隆平. 利用野败选育三系的进展. *全国水稻科研会议*, 1973]
- 5 Wang Y F, Huang J Y. Progress in the study of producing reversible male sterile line by genetic engineering. *Hereditas*, 2011, 33: 40–47
- 6 Huang W C, Hu J, Zhu R S, et al. Research and development of the HL-type cytoplasmic male sterility rice (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2012, 42: 689–698 [黄文超, 胡骏, 朱仁山, 等. 红莲型杂交水稻的研究与发展. *中国科学: 生命科学*, 2012, 42: 689–698]
- 7 Hu J, Huang W C, Huang Q, et al. Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. *Mitochondrion*, 2014, 19: 282–288
- 8 Yi P, Wang L, Zhu Y G, et al. Discovery of mitochondrial chimeric-gene associated with cytoplasmic male sterility of HL-rice. *Chin Sci Bull*, 2002, 47: 744–747
- 9 Peng X J, Wang K, Hu C F, et al. The mitochondrial gene *orfH79* plays a critical role in impairing both male gametophyte development and root growth in CMS-honglian rice. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 125
- 10 Flavell R B. A model for the mechanism of cytoplasmic male sterility in plants, with special reference to maize. *Plant Sci Lett*, 1974, 3: 259–263
- 11 Levings C S III. Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *Plant Cell*, 1993, 5: 1285–1290
- 12 Warmke A, Lee S L J. Mitochondrial degradation in Texas cytoplasmic male sterile corn anthers. *J Hered*, 1977, 68: 213–222
- 13 Hanson M R. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu Rev Genet*, 1991, 25: 461–486
- 14 Li S Q, Wan C X, Zhu Y G, et al. Programmed cell death during microgenesis in a honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria. *Funct Plant Biol*, 2004, 31: 369–376
- 15 Wan C X, Li S Q, Zhu Y G, et al. Chronic oxidative stress result in the abortion of premature microspores in honglian CMS line of rice. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 373–382
- 16 Wen L, Liu G, Zhu Y G, et al. Proteomic analysis of anthers from honglian cytoplasmic male sterility line rice and its corresponding maintainer and hybrid. *Bot Stud*, 2007, 48: 293–309
- 17 Sun Q P, Hu C F, Zhu Y G, et al. Quantitative proteomic analysis of CMS-related changes in honglian CMS rice anther. *Protein J*, 2009, 28: 341–348
- 18 Wang K, Gao F, Ji Y X, et al. ORFH79 impairs mitochondrial function via interaction with a subunit of electron transport chain complex III in Honglian cytoplasmic male sterile rice. *New Phytol*, 2013, 198: 408–418
- 19 Peng X J, Zhang J, Zhu Y L, et al. Expression of a mitochondrial gene *orfH79* from CMS-honglian rice inhibiting the growth of *Escherichia coli* (in Chinese). *Acta Agric Univ Jiangxi*, 2011, 33: 578–583 [彭晓珏, 张健, 朱友林, 等. 水稻红莲型细胞质雄性不育基因 *orfH79* 的表达对细菌生长的抑制. *江西农业大学学报*, 2011, 33: 578–583]
- 20 Liu G, Tian H, Huang Y Q, et al. Alterations of mitochondrial protein assembly and jasmonic acid biosynthesis pathway in Honglian (HL)-type cytoplasmic male sterility rice. *J Biol Chem*, 2013, 287: 40051–40060
- 21 Duroc Y, Gaillard C, Hiard S, et al. Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for

- Ogura cytoplasmic male sterility in Brassiceae. *Biochimie*, 2005, 87: 1089–1100
- 22 Hu J, Wang K, Huang W, et al. The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in hong-lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *Plant Cell*, 2012, 24: 109–122
- 23 Hu J, Huang W C, Huang Q, et al. The mechanism of ORFH79 suppression with the artificial restorer fertility gene Mt-GRP162. *New Phytol*, 2013, 199: 52–58
- 24 Qin X, Huang Q, Xiao H, et al. The rice DUF1620-containing and WD40-like repeat protein is required for the assembly of the restoration of fertility complex. *New Phytol*, 2016, 210: 934–945
- 25 Huang W, Yu C, Hu J, et al. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 14984–14989
- 26 Zhu R S, Yu J H, Ding J P, et al. Research and utilization of honglian type hybrid rice (in Chinese). *Hybrid Rice*, 2010, 25(S1): 12–16 [朱仁山, 余金洪, 丁俊平, 等. 红莲型杂交水稻的研究与实践. *杂交水稻*, 2010, 25(S1): 12–16]
- 27 Li S Q, Tan Y P, Wang K, et al. Gametophytically alloplasmic CMS line of rice (*Oryza sativa* L.) with variant *orfH79* haplotype corresponds to specific fertility restorer. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 1389–1397
- 28 Huang W C, Hu J, Yu C C, et al. Two non-allelic nuclear genes restore fertility in a gametophytic pattern and enhance abiotic stress tolerance in the hybrid rice plant. *Theor Appl Genet*, 2012, 124: 799–807
- 29 Du B, Zhang W L, Liu B F, et al. Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 22163–22168
- 30 Yang H, You A, Yang Z, et al. High-resolution genetic mapping at the *Bph15* locus for brown planthopper resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2004, 110: 182–191
- 31 Zhu R S, Huang W C, Hu J, et al. Breeding of the new sterile line Luohong 4A of Honglian type hybrid rice (in Chinese). *J Wuhan Univ (Nat Sci Ed)*, 2013, 59: 33–36 [朱仁山, 黄文超, 胡骏, 等. 红莲型杂交稻新不育系珞红 4A 的选育. *武汉大学学报(理学版)*, 2013, 59: 33–36]
- 32 Jin J, Li S Q, Xie H W, et al. Germplasm development, discovery and utilization of valuable genes from wild relatives of *Oryza* genus (in Chinese). *J Wuhan Univ (Nat Sci Ed)*, 2013, 59: 10–16 [金杰, 李绍清, 谢红卫, 等. 野生稻优良基因资源的发掘、种质创新及利用. *武汉大学学报(理学版)*, 2013, 59: 10–16]
- 33 Tang S Z, Zhang H G, Zhu Z B, et al. Application of HL type male sterile cytoplasm in *japonica* hybrid rice breeding (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 2010, 24: 116–124 [汤述翥, 张宏根, 朱正斌, 等. 红莲型不育细胞质在杂交粳稻育种中的应用. *中国水稻科学*, 2010, 24: 116–124]

Discovery, utilization and perspective of Honglian cytoplasmic male sterile rice

HU Jun, ZHU RenShan, LI ShaoQing, LI YangSheng, YU JinHong, HUANG WenChao & ZHU YingGuo

College of Life Sciences, State Key Laboratory for Hybrid Rice, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Hybrid rice has been researched and utilized in China for 50 years. Three mainly cytoplasmic male sterile rice are wild abortive (WA), boro-II (BT), and Honglian (HL). Honglian (HL) type hybrid rice has made important contributions to the development of hybrid rice by combining scientific research, application research and industrial utilization. We identified Honglian cytoplasmic male sterile (HL-CMS) gene, *orfH79*, which located downstream of *atp6* in mitochondrial genome. CMS RNA, *atp6-orfH79*, were translated into a cytotoxic protein, ORFH79. Data showed ORFH79 interacts with P61, which is a subunit of complex III of mitochondrial electron transfer chain. This interaction may impair energy production and leads to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria, consequently resulting in abnormal pollen development. Furthermore, we cloned two restorer of fertility (*Rf*) genes, *Rf5* and *Rf6*, both of which are PPR genes. Neither RF5 nor RF6 binds to CMS RNA, *atp6-orfH79*, directly. RF5 interacts with glycine rich protein 162 (GRP162) and RFC3 (restoration of fertility complex subunit 3) thus forming a restoration of fertility complex (RFC) to process CMS RNA. GRP162 can form homodimer and bind to CMS RNA with two binding sites directly. RCF3 is transported into the mitochondria as a membrane protein and functions as a scaffold protein for the assembly of the RFC complex. The RFC complex was detected with a size ranging from 400 to 500 kD. Moreover, *Rf6* encodes a novel pentatricopeptide repeat (PPR) family protein with a characteristic duplication of PPR motifs 3 to 5. Results show RF6 is also targeted to mitochondria, where it physically associates with hexokinase 6 (OsHXX6) and promotes the processing of the aberrant CMS RNA, *atp6-orfH79*, to restore the fertility of CMS line. To create more available germplasm in hybrid rice, we developed a molecular marker of *orfH79* to screen wild rice and bred some novel CMS lines. We also developed molecular markers of *Rf5* and *Rf6* to breed novel stronger restore lines which contain two *Rf* genes. Consequently, we bred several combinations such as Honglian you 6, Yueyou 938, Luoyou 8 and Luoyou 9348 with high yield, good quality, multiple resistance and wide adaptation. HL hybrid rice has been widely planted in Yangzte river areas and South China with the yield of 10 to 12 tons per hectare. HL hybrid rice combinations also have been planted in Southeast Asian countries, such as Vietnam, Indonesia, Malaysia, Bangladesh and Phillippine. Most combinations exhibited 140% or more of yield compared with the local rice cultivars in Southeast Asian countries. HL hybrid rice even more is becoming the leading hybrid rice and priority choice in most of Asian countries and other Africa countries.

hybrid rice, Honglian type, cytoplasmic male sterility, restoration of fertility, germplasm creation

doi: 10.1360/N972016-01094