



评述

红莲型杂交水稻的研究与发展

黄文超, 胡骏, 朱仁山, 李绍清, 王坤, 余金洪, 李阳生, 章志宏, 朱英国*

武汉大学生命科学院, 杂交水稻国家重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: zhuyg@public.wh.hb.cn

收稿日期: 2012-07-15; 接受日期: 2012-08-08

摘要 1972 年, 武汉大学科研人员以红芒野生稻为母本, 与江西地方品种莲塘早父本杂交, 在后代中发现了雄性不育株. 再用莲塘早多代回交, 于 1974 年获得了不育性稳定的株系, 命名为红莲型细胞质雄性不育系(Honglian-type cytoplasmic male sterility, HL-CMS), 莲塘早为其保持系, 红莲型细胞质雄性不育水稻由此问世. 与单核期花粉败育的野败型水稻不同, 红莲型属于二核期配子败育类型, 花粉碘染为圆败, 是杂交水稻新质源. 40 年来, 武汉大学科研人员将基础研究、应用研究和产业化紧密结合, 促进了红莲型杂交水稻的发展. 分子功能验证发现, 不育系线粒体内一编码 79 个氨基酸的可读框 *OrfH79* 为 HL-CMS 不育基因, *ORFH79* 蛋白破坏线粒体正常功能后导致花粉败育. 遗传分析发现, HL-CMS 为双基因恢复模式, 进而克隆了恢复基因 *Rf5* 和 *Rf6*. 育性恢复机理研究表明, 恢复基因 *RF5* 蛋白与 *GRP* 蛋白互作, 组装成 400~500 kD 的分子复合物作用于 *atp6-OrfH79* mRNA, 从而恢复不育性. 借助分子标记辅助选择技术, 创制出新的 CMS 和多基因恢复水稻材料, 并用于育种实践, 选育出高产优质红莲型杂交水稻新组合红莲优 6 号、珞优 8 号和粤优 9 号等, 相继通过了湖北省、广西省和农业部国家农作物品种审定委员会等审(认)定, 构建的红莲型杂交水稻亲本繁殖提纯体系突破了产业化瓶颈. 当前, 红莲型杂交水稻在中国长江流域、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.

关键词杂交水稻
红莲型细胞质
不育基因
恢复基因
红莲型杂交水稻

水稻是中国主要的粮食作物, 是 60% 以上人口的主食, 直接决定着国家的粮食安全^[1]. 在生产实践中, 水稻分为常规水稻和杂交水稻两种类型. 中国的杂交水稻种植面积超过 50%, 占全国水稻总产量的 60% 以上, 对国家粮食安全具有决定性意义^[2]. 杂交水稻是指用 2 个遗传背景不同的水稻亲本杂交得到的 F_1 种子. F_1 具有明显的杂种优势, 田间种植后表现出高产、优质和多抗等优良性状, 供给农民

大面积生产用种. 自 1970 年以来, 中国科研人员先后建立了三系与两系杂交水稻系统来生产 F_1 种子, 取得了举世瞩目的成就. 三系杂交水稻中, 野败型、红莲型和包台型是国际公认的 3 种细胞质雄性不育水稻主要类型, 近年来, 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, 本文将对红莲型杂交水稻的研究进展进行综述.

1 HL-CMS 的发现历史与遗传特点

CMS 是指植物雌性器官正常产生雌配子, 但由雄性器官细胞质(目前发现的都为线粒体)遗传因子控制的雄性器官异常, 雄配子不能受精结实的生物学现象. 20 世纪 70 年代, 袁隆平^[3]在海南南红农场的野生稻群体中, 发现了一株花粉败育而柱头正常的单株, 简称“野败”(wild abortion, WA), 随后组织全国大协作, 用常规水稻做父本杂交并连续回交, 得到了不育性稳定的不育株系与相应保持系, 同时用国内外品种(系)与不育系测交配组, 产生了优势很强的 F_1 种子, 实现了三系配套. 野败型不育系植株的花粉表现为单核期败育, 呈现为中空干瘪无规则形状, 1%碘-碘化钾溶液下不着色(图 1A), 称做典败; 细胞学观察发现, 花药的绒毡层细胞提前发生异常, 不能供给花粉正常生长所需的营养和能量, 从而导致不育; 遗传学分析发现, 其败育是由植株(孢子体)的基因型决定, 而与配子的基因型无关, 故称为孢子体不育类型. CMS 植株的发现是三系杂交水稻系统利用成功的关键, 除了从自然界中发现天然 CMS 不育植株外, 利用远源杂交获得 CMS 植株也是一种重要途径. 为此, 1972 年, 武汉大学^[4]采用野生稻与常规水稻品种互为父母本进行大量杂交, 结果在红芒野生稻和莲塘早这对组合的杂交后代中发现了不育单株, 随后通过多代回交, 于 1974 年获得了不育性稳定的株系与相应保持系, 并筛选出恢复系, 实现了三系配套, 成功培育出红莲型杂交水稻. 红莲型不育系花粉表现为二核期败育, 败育花粉粒呈现中空圆形, 1%碘-碘化钾溶液下不着色(图 1B), 称为圆败; 细胞学观察花药的绒毡层细胞未见异常, 遗传学分析发现, 其败育由体配子的基因型

决定, 故称作配子体不育. 日本科学家培育的包合(BT)型、CW 型和 LD 型不育系也属于此类, 但它们的花粉败育发生在三核期和三核后期. 败育花粉粒呈圆形, 1%碘-碘化钾溶液下与正常花粉粒一样着黑色(图 1C), 称为染败.

2 HL-CMS 基础理论研究

回顾杂交水稻取得成功的经验, 关键是 CMS 植株的发现与利用. 在花粉发育的各个阶段, 任何异常都将导致 CMS 的出现. 从分子水平研究 CMS 产生和 CMS 恢复正常的原因, 将能够对育性新种质进行原始创新, 促进杂交水稻可持续地发展. 基于此, 武汉大学利用红莲 CMS/Rf 系统, 开展了深入研究, 取得了良好的进展.

2.1 HL-CMS 不育基因克隆与机理研究

(1) HL-CMS 不育相关片段鉴定. 研究普遍认为, CMS 是线粒体基因控制的母性遗传, 不育基因为线粒体基因组序列. 为获得 HL-CMS 不育相关片段, 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. 用线粒体基因 *atp6* 为探针筛选文库对阳性克隆测序, 发现在 YTA 线粒体基因组 *atp6* 基因下游 200 bp 处, 存在一个编码 79 个氨基酸的嵌合片段, 由 *cox1* 基因的部分编码序列以及一段未知来源的序列构成, 定名为 *orfH79*^[5]. 与已鉴定的 BT 型水稻不育基因 *orf79* 相比, *orfH79* 上游(与 *atp6* 的间隔区)存在一个 36 bp 的非同源序列, 而编码区同源性高达 97%. 在 HL-CMS 不育系中, *orfH79* 有两种存在方式, 一种是与 *atp6* 基因共转录为 2.0 kb 的分子, 另一种是以 0.5 kb 的方式独立存在, 定名为 *orfH79(s)*. 引入恢复基因后, *atp6-orfH79*

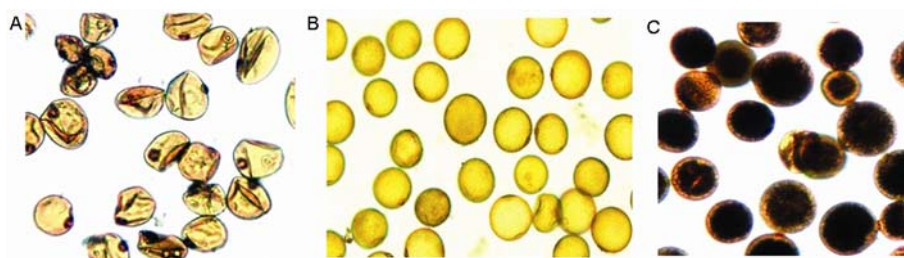


图1 水稻3种CMS花粉1%碘-碘化钾染色表型
A: WA-CMS; B: HL-CMS; C: BT-CMS

mRNA 被剪接为 1.5 和 0.45 kb, 同时, *orfH79(s)* 也被剪接为 0.45 kb^[6], 进一步表明 *orfH79* 是与红莲型水稻不育相关的片段。

(2) HL-CMS 不育基因功能互补验证. CMS 是植物界的普遍现象, 在多种植物中都发现过与 CMS 相关的片段, 但进一步完成功能验证的却很少, 主要原因是植物线粒体基因转化难. 若将不育基因与线粒体信号肽序列融合构建成转化子, 使不育基因产物进入育性正常的水稻线粒体行使功能, 产生不育, 则可实现不育基因的功能互补验证, Wang 等人^[7]用此方法证实了 *orf79* 为 BT 型水稻不育基因. 用类似的方法, 将 *orfH79* 与线粒体信号肽融合后, 在玉米泛素基因启动子 PUBi 的控制下, 以育性正常的水稻材料籼锦 B 为受体材料完成遗传转化, 结果发现以 Ubi 为启动子的 T₀ 代转基因植株中有 5 株花粉败育, 均为圆败, 其不育性在 T₁ 代中稳定遗传, 证明了 *orfH79* 是红莲型配子体 CMS 基因^[8].

(3) HL-CMS 不育分子机理研究. CMS 是复杂的生物学现象, 主要存在两种假说, 一是能量假说, 二是毒性假说. 用 HL-CMS 系统研究发现, 以不育基因多肽 ORFH79 制备抗体, 免疫电子显微镜检测不育系花粉, 观察到 ORFH79 蛋白主要定位于线粒体^[8], 同时发现, ORFH79 严重影响细菌和酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的正常生长^[9], 与 ORF79^[7]具有相同的生理毒性, 偏向毒性假说. 另一方面, 用双向电泳和 ICAT 等蛋白质组学技术, 分析了红莲型水稻不育系与相应保持系花粉各发育时期的蛋白质表达情况, 发现大量涉及细胞凋亡、能量合成、淀粉合成和细胞骨架等功能和结构的差异蛋白^[10,11]; 对不育系四分体时期的小孢子观测则发现了细胞凋亡信号, 且出现随着 ROS 含量和抗氧化系统相关蛋白活性的上调, ATP 含量和线粒体膜透势发生下调并有核 DNA 损伤等现象^[12,13]. 这些证据推测, ORFH79 不育蛋白可能以某种直接或间接方式影响电子传递链, 致使电子泄漏造成线粒体膜透势下降, 伴随产生出过量的 ROS, 对小孢子发育形成较大压力, 引起小孢子凋亡等下游事件, 最终出现不育, 支持能量假说. 尽管对 CMS 这种自然界普遍存在的生物学现象的研究已有上百年的历史, 但要证实导致不育的根源是能量匮乏还是毒性伤害, 或是二者兼有之, 还需更多的分子实验证据.

2.2 HL-CMS 恢复基因克隆与机理研究

(1) HL-CMS 双恢复基因的发现与多基因恢复模式. HL-CMS 属于配子体不育类型, 雄配子(花粉)发育是否正常是由自身基因型决定的, 含恢复基因的花粉正常发育, 不含恢复基因的则败育, 这与孢子体 CMS 不同. 孢子体 CMS 花粉的命运由植株基因型决定, 含恢复基因的植株, 其花粉正常, 不含恢复基因的植株, 其花粉败育. HL-CMS 二核期败育, 花粉表型极易鉴定, 败育花粉碘染不着色. 这与 BT 型、CW 型及 LD 型 CMS 不同, 它们败育的花粉碘染着黑色, 很难与正常花粉区分开来. 基于这两点, 本实验室发现了 HL-CMS 的两对恢复基因 *Rf5* 和 *Rf6* 及配子体 CMS 类型的多基因恢复模式.

2002 年, 红莲型杂交水稻新组合红莲优 6 号通过湖北省品种审定委员会破格审定, 在全国不同生态条件下种植, 结实率均在 90% 以上, 表现优良; F₁ 花粉检查发现其平均单株花粉可育度在 75% 以上, 这种现象与配子体雄性不育作物存在一对恢复基因时的花粉育性分离比不相吻合. 而有些恢复系如密阳 23、明恢 63 等对 YTA 测交, F₁ 花粉可染率只有 50%, 在自然条件下结实率在 80% 以上, 但有的结实率差, 不稳定. 最初, 用密阳 23 为父本, 发现 HL-CMS 为单基因恢复, 命名为 *Rf5*^[14]. 后来为了克隆 *Rf5*, 又针对组合红莲优 6 号, 以 YTA 为母本, 9311 为父本, 分别构建了 BC₁F₁ 和 F₂ 两个遗传群体, 并以花粉的表型为目标性状, 考察群体的所有单株, 结果在不同的遗传群体中均发现 HL-CMS 的不育性受两对不同的恢复基因控制, 其中一对即为先前发现的 *Rf5*, 位于第 10 染色体, 另一对命名为 *Rf6*, 定位于第 8 染色体^[15]. 遗传分析发现, 1 对恢复基因时, 杂种 F₁ 单株花粉 50% 恢复正常, 2 对恢复基因时, 杂种 F₁ 单株花粉 75% 恢复正常, 3 对 87.5%, 4 对 93.75%, 以此类推(图 2). 这与孢子体 CMS 恢复不同, 理论上, 孢子体 CMS 的杂种 F₁ 单株只需 1 对恢复基因, 其花粉就全部恢复正常. 多基因恢复模式的发现表明, 配子体 CMS 作物可以实现孢子体 CMS 的杂种 F₁ 育性恢复的表型, 这为选育配子体 CMS 强恢复系提供了理论指导.

(2) HL-CMS 育性恢复分子复合体研究. 首个被克隆的恢复基因是 T 型 CMS 玉米的 *Rf2*, 编码线粒

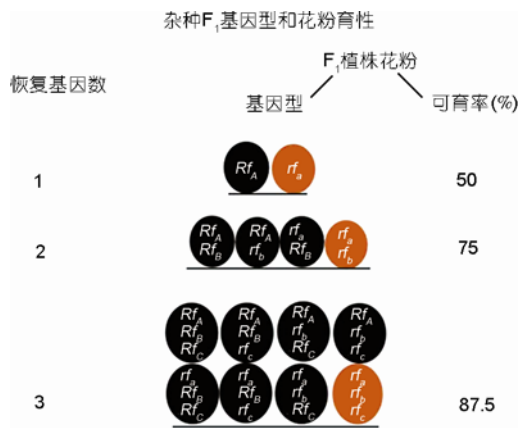


图2 配子体CMS多基因恢复模式^[15]

体的乙醛脱氢酶^[16]。2002年,矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm)CMS的恢复基因 *PPR591* 被克隆,编码591个氨基酸,并以35个氨基酸组成一个基元(PPR基元),多个PPR基元串联,不同基元内某些氨基酸具有保守性,N端是线粒体信号肽,定位于线粒体,属于PPR家族的典型成员^[17]。自矮牵牛的 *PPR591* 被发现具有CMS育性恢复功能后,萝卜CMS的 *Rfo*,水稻BT-CMS的 *Rf1a* 及 *Rf1b* 和A3型高粱CMS的 *PPR13*

等恢复基因被相继克隆,它们都为 *PPR* 基因^[17,18-20]。*PPR* 基因分为P和PLS两个亚家族,P亚家族C端无功能结构域,PLS亚家族的C端具有E或DYW等功能结构域,而E或DYW等结构域被证实可以与RNA互作^[21]。目前,除A3型高粱CMS的 *PPR13* 具有E结构域外,其余被克隆具有恢复功能的PPR基因都没有E或DYW功能结构域,属于P亚家族。在HL-CMS恢复基因 *Rf5* 与BT-CMS的 *Rf1a* 是等位基因且编码相同的氨基酸^[6],也属于P亚家族。前期研究认为, *RF1A* 可直接与不育基因转录本 *atp6-orf79*mRNA 互作,进而剪接 *atp6-orf79*mRNA 恢复不育性^[22]。研究发现,在HL-CMS/*Rf*系统中, *RF5* 不能与不育基因转录本 *atp6-orfH79* mRNA 互作,而是与一个富含GRP的蛋白GRP162互作,而GRP162与 *atp6-orfH79* mRNA 互作,并与一些未知蛋白因子形成400~500 kD大小的分子复合体剪接 *atp6-orfH79* mRNA,进而抑制 *orfH79* 翻译而恢复育性^[6]。由此,提出了恢复基因恢复CMS的分子模型: *RF5* 进入线粒体,与GRP162和其他蛋白因子组装为分子复合体,作用于不育基因相关 *atp6-orfH79* mRNA,破坏不育基因的翻译,最终不育性被恢复(图3)。

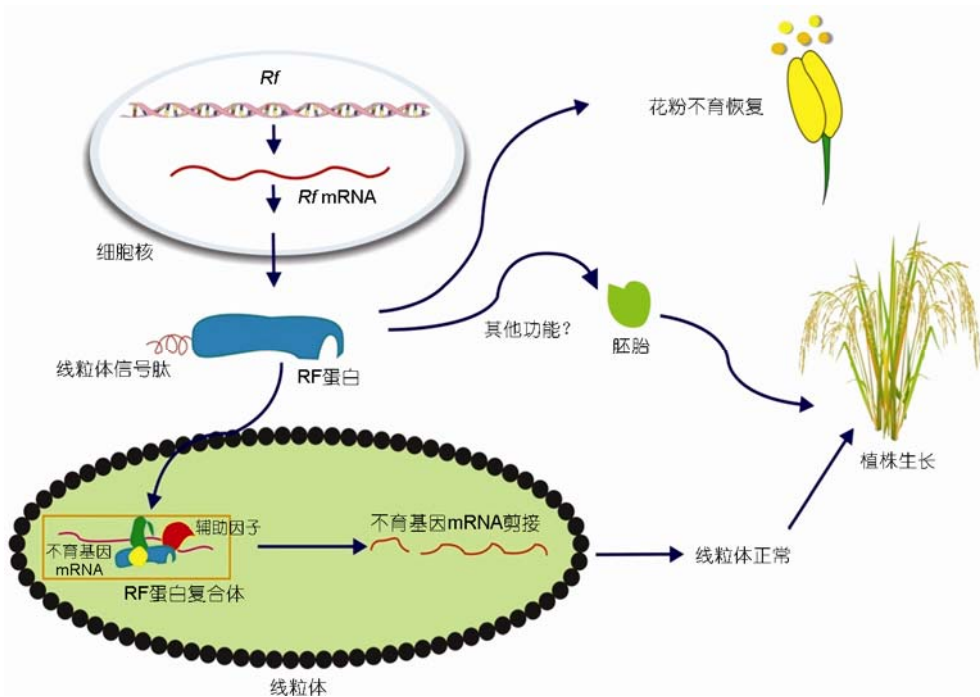


图3 育性恢复的分子模型^[23]

2.3 基于 CMS/*Rf* 研究, 创制杂交水稻新种质

新不育系和恢复系的创制是杂交水稻的重要内容, 是保证可持续发展杂交水稻的关键, 在克隆 HL-CMS 不育基因 *orfH79* 及恢复基因 *Rf5* 和定位 *Rf6* 的基础上, 用 *orfH79* 作为分子标记, 从 146 份 AA 基因组野生稻和 190 份农家种中选出 8 份材料, 进一步通过杂交回交培育出 w15A, w20A, w34A 和 w46A 等新不育系, 表现出二核期败育, 不育性稳定, 是典型的配子体 CMS 水稻材料^[24]. 用 *Rf5* 和 *Rf6* 相关分子标记从野生稻、农家种和优良亲本中选出具有 *Rf5* 和 *Rf6* 的种质资源, 进行优良恢复系聚合育种. 生产上, HL-CMS 恢复谱虽广, 但强恢复系不多, 分析发现大多恢复系只有 1 对恢复基因, 恢复度只有 50%, 而实现产业化的 HL-CMS 水稻当家品种“珞优 8 号”, 其父本 R8108 含有两对恢复基因 *Rf5* 和 *Rf6*, 恢复度达 75%, 表现优异; 多恢复基因模式的发现, 进一步为选育配子体 CMS 的强恢复系提供了理论依据. 由此, 用分子标记辅助选择技术, 改良仅含单恢复基因的恢复系, 聚合选育含多对恢复基因的新恢复系, 有力促进了红莲型杂交水稻的发展.

3 HL-CMS 应用研究

红莲型原始不育系红野莲塘早表现为高秆, 在生产上不能被使用, 先前转育的红野华矮 15A, 育性不好, 遇高温花药开裂. 为此, 20 世纪 90 年代, 武汉大学分析了国内外对杂交水稻的研究现状, 把高产优质和细胞质多样性放在重要位置, 收集国内外多种类型的不育系和保持系, 包括野败型、红莲型、包

台型、冈、D 型、K 型、II-32 型和马协型等 22 个, 进行育性、开花习性、米质和配合力等综合性状分析, 最后选择红莲型粤泰不育系和相应保持系为主攻目标进行红莲型杂交水稻研究, 取得了突破性进展.

3.1 HL-CMS 不育性提纯

李阳生等人^[25]以红莲型不育系粤泰 A 和相应保持系粤泰 B 为主攻目标, 从提纯保持系入手, 进行成对单株回交并自交, 7 和 8 月份高温下, 在武汉地区选育圆败型花粉率 100% 和结实率为 0 的材料用做原原种, 扩大繁殖后用作原种, 来制备生产种(图 4). 通过多年实践, 最终建立了核心种-原原种-原种-生产种的完善体系, 确保了 HL-CMS 不育系纯度, 突破了红莲型杂交水稻产业化瓶颈.

3.2 HL-CMS 不育系创新

攻克了 HL-CMS 水稻的不育性纯度后, 由于不育系 YTA 开花习性好、柱头外露率高、配合力强, 因此第一个被用于大面积生产制种. 为进一步创新不育系, 本实验室用诱变育种的方法在红莲型保持系 YTB 变异后代中选择早熟单株, 与 YTA 连续多代回交选育出新的 HL-CMS 不育系珞红 3A. 珞红 3A 除了具有 YTA 的优点外, 其米质更好, 生育期更短, 2006 年通过湖北省品种审定, 2008 年通过湖北省科技成果鉴定, 2009 年获得植物新品种权证书. 最近, 在珞红 3A 的基础上, 又通过分子标记辅助选择和常规育种技术紧密结合, 把来自野生稻的抗褐飞虱 *Bph14*^[26] 与 *Bph15*^[27] 聚合到珞红 3A 中, 选育出高抗褐飞虱的红莲型新不育系珞红 4A, 通过湖北省科技

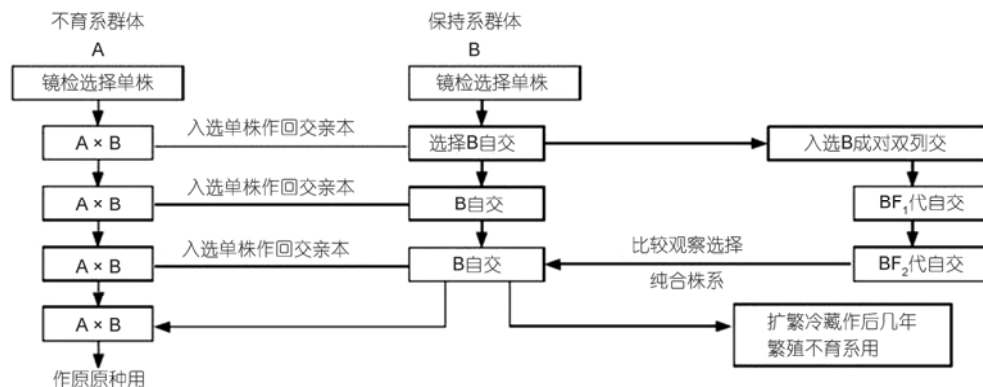


图 4 红莲型不育系提纯复壮程序^[25]

成果鉴定,被国内多家育种单位引用,使红莲型杂交水稻不断创新。

3.3 HL-CMS 突破性品种选育

在提纯 YTA 不育系和保持系的同时,对 HL 型不育系的恢复系进行选育,收集当前国内外优良品种和恢复系 1000 余个,用 YTA 做母本,通过大规模的测交实验,于 1999 年筛选出扬稻 6 号、特青和 E32 等恢复系,并经过复测和组合比较实验。2001 年,组合 YTA/扬稻 6 号参加湖北省中稻区域实验,表现特别优异,2002 年被湖北省品种审定委员会破格审定,定名为红莲优 6 号。目前,HL-CMS 已选育出 20 多个杂交水稻品种通过审定,其中,红莲优 6 号和珞优 8 号最具代表性。红莲优 6 号 2004 年通过国家审定,2006 年获得品种保护权;珞优 8 号是以珞红 3A 为母本, R8108 为父本配组而成,2006 年通过湖北省品种审定,2007 年通过国家品种审定,2009 年通过农业部超级稻认定并获得品种保护权,2010 年被列为长江流域主推品种,2007~2012 连续 5 年被列为湖北省主推品种。最近,本实验室又利用抗褐飞虱红莲型新不育系珞红 4A 大规模配组,获得了 10 多个杂种优势很强的苗头组合,这些组合不但把产量和米质综合在较高的水平,而且表现出良好的抗性,具有突破性,前景良好。

4 HL-CMS 水稻产业化

4.1 HL-CMS 水稻主要特点

红莲型杂交水稻有 5 个明显特点: (i) 产量高: 2003 年,湖南常德市种子管理站组织对安乡、桃源、澧县的红莲优 6 号进行大面积测产显示,该组合大面积生产平均亩产 620.1 kg,其中高产丘块 862.3 kg,生产潜力超过 900 kg; (ii) 米质优: 以红莲粤泰 A 配组的红莲型杂交水稻一般能达到国标优质米标准,其中以珞红 3A 配组的珞优 8 号达到国家优质二级米标准; (iii) 适应性广: 红莲型杂交水稻除适合长江流域和华南地区种植外,还适合于东南亚地区,如 2005 年,红莲优 6 号在孟加拉国进行试种,表现非常突出,比当地主栽品种增产 40%~50%,深受当地农民欢迎; (iv) 制种产量高: 红莲型杂交水稻开花习性好、异交率高,制种产量一般亩产 450~500 kg

左右,高产的可达 700 kg 以上; (v) 耐高温性能较强。2003 年 8 月和 2007 年 7 月,湖北省局部地区出现少见的高温炎热天气,大部分野败型杂交水稻结实率只有 40%~50%,而红莲型杂交水稻结实率保持在 70%以上。总之,红莲型杂交水稻株叶形态好、米质优、穗粒结构好、生育期适中、抽穗期耐高温能力强、可抗白叶枯病、配合力好,是中国杂交水稻的典范。

4.2 HL-CMS 水稻产业化发展模式

依托 HL-CMS 先锋组合红莲优 6 号和珞优 8 号,组建了两家民营企业进行产业化,效果很好。其中,尤以珞优 8 号“政-产-学-研”的产业化模式最具特色。2006 年,成立武汉国英种业有限责任公司,集中推广珞优 8 号,公司以学校研发为依托,通过政府引导,连续 3 年举办百亩、千亩、万亩高产示范片,并召开大型示范现场观摩会。其中,2009 年在湖北孝感举办的“绿色优质超高产水稻珞优 8 号 30 万亩示范工程”成为目前国内单个品种面积最大的示范工程,影响很大,推动了红莲型杂交水稻产业化进程。目前世界范围内,红莲型杂交水稻累计种植面积达 1 亿亩以上,还在不断攀升。国际上,特别是东南亚,如越南、印度尼西亚、马来西亚、孟加拉和菲律宾等国家,红莲型杂交水稻表现十分突出。其中,红莲型杂交水稻珞优 8 号在越南创下三项第一: 单个品种销售量第一、单个品种种植范围第一及品种综合质量评比第一。据统计,东南亚国家常年水稻种植面积约 7.5 亿亩,市场巨大,为红莲型杂交水稻产业化提供了良好的前景。

4.3 良种良法配套,栽培技术深入田间

针对红莲型杂交水稻的生理特性和不同的生态环境,通过精确定量管理,形成了“壮-足-大”的栽培模式,其中对红莲型杂交水稻珞优 8 号湖北随州千亩示范片实收面积 0.312 亩,收获鲜谷 273 kg,折合成干谷 834.8 kg/亩,通过了国家粮食丰产科技工程专家组验收。“壮-足-大”栽培模式的“壮”指沙床早育、抛寄、化控促壮秧,“足”指插足基本苗、控制最高苗、保证足穗,“大”指精量施肥、适度控制、保证穗大粒饱。为了充分发挥红莲杂交稻生产潜力,通过举办农民技术员、种田大户培训班,以及现场观摩等

形式,把“壮-足-大”的栽培模式大面积推广,让栽培技术深入田间,给农民带来实惠,间接拉动了红莲型杂交水稻的产业化规模。

5 HL-CMS 水稻的发展

5.1 作物杂种优势与杂交水稻

(1) 作物杂种优势. 1876 年,达尔文提出杂种优势现象,认为杂种 1 代的表现优于亲代,在植物中杂种优势是普遍现象. 136 年过去了,人们利用这种生物学现象进行粮食生产取得了巨大成绩. 据统计,利用杂种优势,全世界年增产粮食 8 千万吨,相当于每年扩大种植面积 4.2 亿亩. 就水稻而言,1976~2003 年,推广杂交水稻使中国稻谷产量累积增加 4 亿吨,相当于扩大了近 9.9 亿亩的水稻种植面积^[28]. 为了揭示杂种优势的遗传学本质,1908 年,Shull 提出杂种优势的超显性假说,1917 年, Jones 进一步补充为显性连锁基因假说;1910 年, Bruce 又提出杂种优势的显性假说;而经典数量遗传学认为,非等位基因之间存在上位性效应,提出了杂种优势的上位性理论. 这些假说分别得到了一些研究结果的支持,如 1992 年, Stuber 等人^[29]通过分析玉米杂种优势的遗传基础认为,超显性效应对玉米杂种优势起主要作用,支持超显性假说;1995 年, Xiao 等人^[30]发现,杂种优势与整个基因组的杂合性相关不显著,认为水稻杂种优势主要取决于亲本基因的显性互补作用,支持显性假说;1998 年,余四斌等人^[31]发现,双基因互作现象在杂交水稻中普遍存在,并推断上位性效应在杂种优势的形成中起决定作用,支持上位性理论. 虽然杂种优势遗传的基础理论研究不断发展,但同杂种优势利用实践还存在一定距离,当前选育强优势杂交组合主要依靠大量的田间组合评价,手段相对落后,要进一步提高杂种优势的利用水平,还应深入研究杂种优势的遗传基础和分子机理,加快技术创新.

(2) 杂交水稻的发展. 杂交水稻是伟大创举,是水稻育种史上的原始创新,处于国际领先地位. 1964 年,袁隆平在洞庭早粳中发现雄性不育株,开始了中国杂交水稻研究;1970 年,袁隆平学生李必湖等人在海南南红农场沟边普通野生稻中发现花粉发

生败育的单株,随后组织全国水稻界专家联合开展研究. 1973 年实现三系配套,1976 年大面积推广,同时育成了红莲型、冈、D 型等多种不育系和恢复系,实现杂交水稻遗传多样性和稳定推广. 杂交水稻利用途径主要是两系法和三系法. 1973 年,湖北省仙桃市农业技术员石明松在晚粳农垦 58 的大田中发现了光敏不育水稻农垦 58S,其不育性受光温调控,既可做不育系也能作保持系,一系两用,简化了种子生产程序,随后在 80 年代中后期全国掀起了两系杂交水稻研究热潮. 目前,国内两系法杂交水稻约占 40%,进展很快. 由于光温条件对三系法不育系的不育性没有影响,所以其不育性更加稳定,同时种子生产的技术体系也很完善,因此三系法杂交稻仍占 60%,对国家粮食安全起到重要作用. 在全国农业科技人员长期艰苦奋斗下,杂交水稻从三系、两系发展到今天的超级稻,不断创新,成绩世界瞩目. 杂交水稻将理想株型与杂种优势相结合,把高产、优质、多抗、稳产和广适性紧密相结合,充分利用现代分子生物学技术,提高育种效率;另外,还应注意杂交水稻的遗传多样性,发展不同类型的杂交水稻,保持优势种群和遗传差异,防止不育系和恢复系同质化,避免因细胞质单一所带来的潜在危险.

5.2 HL-CMS 水稻的发展

HL-CMS 花粉败育位于野败和包台之间,是中国杂交水稻特异的新种质,是杂交水稻三系研究的重要内容. 为了把 HL-CMS 作用发挥到极致,武汉大学科研人员从发现 HL-CMS 以来,一直将基础研究、应用研究和产业化相结合,长期坚持,最终实现了红莲型杂交水稻杂种优势利用上的突破. 面对现代分子生物学技术不断革新的趋势,今后,红莲型杂交水稻将充分利用功能基因组的研究成果,以高产、优质、多抗和广适性协调发展为育种目标,挖掘利用好 HL-CMS 的理论和应用价值,促进红莲型杂交水稻的发展.

(1) HL-CMS 细胞质的利用. 通过 40 年的积累,在籼稻上,利用红莲型细胞质先后选育出 YTA、珞红 3A 和珞红 4A 等优良不育系,选配的红莲优 6 号、珞优 8 号和粤优 9 号等红莲型杂交水稻组合大面积推广应用. 同时,研究发现,红莲型细胞质还可用于粳稻,当前杂交粳稻利用的细胞质主要是 BT 型,为三核期

染败类型, 花粉败育相对较晚, 种子生产风险相对较大; 野败型虽然败育彻底, 但恢复系难找, 应用受到限制. 红莲型为圆败类型, 与 BT 型水稻的染败相比, 其败育相对彻底, 降低了生产风险; 红莲型恢复谱广, 除恢复基因 *Rf5* 外, 新恢复基因 *Rf6* 和多基因恢复模式都可用于粳稻; 扬州大学已培育出表现优异的红莲型粳稻新不育系^[32]. 据统计, 中国目前水稻种植面积约 4.2 亿亩, 其中籼稻约 3.0 亿亩, 粳稻约 1.2 亿亩, 杂交籼稻约占籼稻种植面积的 70%, 而杂交粳稻只占粳稻品种的 6% 左右^[1], 利用红莲型细胞质发展杂交粳稻, 空间很大. 籼稻、粳稻为水稻两个亚种, 籼粳亚种间杂种具有强大杂种优势, 红莲型细胞质在籼粳亚种杂种优势利用上, 具有很好的潜力. 品种间杂交是当前水稻杂种优势利用的主要途径, 而利用籼粳亚种间的杂种优势还未突破, 利用红莲型细胞质和现代生物学技术, 加快籼粳亚种不育系和恢复系选育, 尽快突破籼粳亚种优势利用, 选育出红莲型籼粳亚种杂交水稻新组合.

(2) 现代生物技术发展 HL-CMS 水稻. 今天, 随着分子生物学技术的迅猛发展, 科学家们对生物的遗传本质认识已经深入到了 DNA, RNA 和蛋白质等分子水平. 水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 在禾谷类作物中基因组最小, 且与其他禾谷类之间有广泛共线性, 是很好的模式作物. 2005 年, 水稻全基因组测序完成, 水稻研究步入功能基因组学时代; 同时, 测序技术从一代、二代到三代, 不断突破, 测序规模更大, 测序成本更低, 为高通量、大规模鉴定新基因提供了便捷, 也为红莲型杂交水稻大发展提供了机遇. 另外, 包括图位克隆、表达序列标签、cDNA 微阵列、DNA 芯片、蛋白质组学以及反向遗传学等各种基因功能鉴定方法日趋完善. 目前, 已克隆与产量、品质和抗性相关的重要新基因近 100 个^[33-35], 对解析水稻重要基因的生物学功能意义重大. 而以基因挖掘为基础的水稻分子标记辅助选择技术与常规育种技术相结合, 十分实用, 极大地提高了育种选择效率. 用各种手段组装高产、优质和多抗等重要性状基因, 创造优异骨干亲本用于实践, 成为未来杂交水稻发展的趋势. 发展红莲型杂交水稻除了要用好杂交、回交等常规育种方法外, 还要把分子标记辅助选择技术、转基因技术以及其他现代

生物学研究成果利用起来进行遗传改良, 聚合各种有利基因, 创制出各种优异新种质, 实现红莲型杂交水稻高产、优质、多抗和广适应性等综合性状上的新突破.

(3) HL-CMS 新不育系、恢复系及强优势组合选配. 红莲型杂交水稻的发展, 关键是选育出新不育系、恢复系和强优势组合. 最近, 本实验室将常规育种技术与分子标记辅助选择技术相结合, 成功选育出高抗褐飞虱的红莲型新不育系珞红 4A; 同时, 用远源杂交方法, 从野生稻中获得了抗稻曲病材料; 通过改良红莲型保持系, 获得了抗稻瘟病的新材料; 这些都为进一步选育红莲型实用新不育系奠定了坚实的基础; 另一方面, 红莲型杂交水稻恢复系选育要注重选育花粉量大、农艺优良性状、配合力好、米质优、耐高温、含两对以上恢复基因的优良恢复系; 同时开展红莲型杂交水稻的籼粳交相关研究, 并通过大规模组合测配和小组合田间优势考察, 选育高产、优质、多抗和广适应性的强优势新组合, 持续发展红莲型杂交水稻.

(4) HL-CMS 水稻产业化发展. 中国是世界上最大的杂交水稻种子生产国和消费国, 具有庞大的杂交水稻种子市场. 国际上, 已有 30 多个国家和地区在研究、试种和推广杂交水稻, 其中东南亚地区的越南、菲律宾、印度尼西亚、孟加拉、巴基斯坦和缅甸等 6 国及美国与印度都已经实现杂交水稻的商业化应用, 年需杂交水稻种子约 4 万吨, 占中国种子生产总量的 15% 以上, 成为杂交水稻种子进口的主要国家. 红莲型杂交水稻除在中国受到普遍欢迎外, 由于在东南亚地区表现优异, 已成为杂交水稻出口品种的主力军. 据统计, 在 2010 年间, 红莲型杂交水稻种植面积越南约 75 万亩, 占其杂交水稻种植面积的 7%; 菲律宾约 45 万亩, 占其杂交水稻种植面积的 10%; 印度尼西亚约 75 万亩, 占其杂交水稻种植面积的 20%; 孟加拉约 60 万亩, 占其杂交水稻种植面积的 13%. 在将来中国杂交水稻种子出口市场中, 红莲型杂交水稻无疑是最重要的品种, 因此要把红莲型杂交水稻国内推广与国外发展相结合, 在不断研发出强优势新组合的同时, 将规模化、机械化和信息化相结合, 搞好种子生产, 保障国内外生产用种安全, 为国家和世界粮食安全做更大贡献.

参考文献

- 1 Cheng S H, Fang F P. Report of Rice Industry of China in 2009. Beijing: China Agriculture Press, 2009(In Chinese)
- 2 Wu X J. Prospects of developing hybrid rice with super high yield. *Agron J*, 2009, 101: 688–695
- 3 袁隆平. 利用野败选育三系的进展. 全国水稻科研会议, 苏州, 1973
- 4 Li S Q, Yang D C, Zhu Y G. Characterization and use of male sterility in hybrid rice breeding. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49: 791–804
- 5 Yi P, Wang L, Zhu Y G, et al. Discovery of mitochondrial chimeric-gene associated with cytoplasmic male sterility of HL-rice. *Chinese Sci Bull*, 2002, 47: 744–747
- 6 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
- 7 Wang Z H, Zou Y J, Li X Y, et al. Cytoplasmic male sterility of rice with boroII cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell*, 2006, 18: 676–687
- 8 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
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 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
- 13 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
- 14 黄青阳, 何予卿, 朱英国, 等. 利用微卫星标记定位红莲型细胞质雄性不育恢复基因. *科学通报*, 1999, 44: 1517–1520
- 15 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
- 16 Cui X, Wise R P, Schnable P S. The rf2 nuclear restorer gene of male sterile T-cytoplasm maize. *Science*, 1996, 272: 1334–1336
- 17 Bentolila S, Alfonso A A, Hanson M R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 10887–10892
- 18 Brown G G, Formanova N, Jin H, et al. The radish Rfo restorer gene of ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J*, 2003, 35: 262–272
- 19 Komori T, Ohta S, Murai N, et al. Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-I*, in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J*, 2004, 37: 315–325
- 20 Klein R R., Klein P E, Mullet J E, et al. Fertility restorer locus Rf1 of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 994–1012
- 21 Chase C D. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial -nuclear interactions. *Trends Genet*, 2007, 23: 81–90
- 22 Kazama T, Nakamura T, Watanabe M, et al. Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant J*, 2008, 55: 619–628
- 23 Saha D, Prasad A M, Srinivasan R. Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiol Bioch*, 2007, 45: 521–534
- 24 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 speciWc fertility restorer. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 1389–1397
- 25 李阳生, 朱仁山, 李绍清, 等. 优质高产广适应性红莲型杂交稻选育. *实验研究*, 2009, 1: 78–80
- 26 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
- 27 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

- 28 Cheng S H, Zhuang J Y, Fan Y Y, et al. Progress in research and development on hybrid rice: a super-domesticated in China. *Ann Bot* London, 2007, 100: 959–966
- 29 Stuber C W, Lincoln S E, Wolff D W, et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*, 1992, 132: 823–839
- 30 Xiao J, Li J, Yuan L, et al. Dominance is the major genetic basis in rice as revealed by QTL analysis molecular markers. *Genetics*, 1995, 140: 745–754
- 31 余四斌, 李建雄, 徐才国, 等. 上位性效应是水稻杂种优势的重要遗传基础. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 1998, 38: 333–342
- 32 汤述翥, 张宏根, 顾铭洪, 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
- 33 Xing Y Z, Zhang Q F. Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 421–442
- 34 鄂志国, 王磊. 水稻抗病性基因的克隆和功能研究进展. *遗传*, 2009, 31: 999–1005
- 35 吴健, 刘学, 王永红. 植物重要功能基因研究进展及其应用. *生命科学*, 2011, 23: 168–178