DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.02076

水稻 *ptc1* 隐性核不育系的创制及其配合力分析

李京琳 李佳林 李新鹏 安保光 曾翔 吴永忠 黄培劲 龙湍*

海南波莲水稻基因科技有限公司, 海南海口 570203

摘要: 细胞质雄性不育系和光温敏雄性不育系是目前杂交水稻育种、制种中广泛利用的两种不育系, 然而这两种不育系分别具有组配不自由和育性不稳定的缺陷。隐性核雄性不育系可以克服上述缺陷, 创制、鉴定和利用细胞核雄性不育系将成为新一代杂交水稻技术的重要环节。本研究通过筛选 9311 的辐射诱变突变体库, 获得了一个无花粉型隐性核雄性不育突变体 *ptc1-2*。图位克隆发现 *ptc1-2* 的突变位点位于 9 号染色体上, 是一段包含 *PTC1* 编码区在内 259.37 kb 的大片段缺失。共分离检测表明, 雄性不育表型是由 *ptc1-2* 突变位点造成的。通过分子标记辅助选择将 *ptc1-2* 突变位点回交转育至两系不育系 C815S 和三系保持系五丰 B 中, 在 BC₃F₃ 世代分别获得与轮回亲本性状相似的隐性核不育系 C815G 和五丰 G。配合力分析表明, C815G 和五丰 G 分别具有与 C815S 和三系不育系五丰 A 基本相同的配合力水平。本研究为隐性核不育系的创制提供了新的基因和材料资源, 并证实了隐性核不育系代替现有三系和两系不育系的可行性。

关键词: 水稻; 雄性不育; *ptc1*; 图位克隆; 回交转育; 配合力分析

Creation and combining ability analysis of recessive genic sterile lines with a new *ptc1* locus in rice

LI Jing-Lin, LI Jia-Lin, LI Xin-Peng, AN Bao-Guang, ZENG Xiang, WU Yong-Zhong, HUANG Pei-Jing, and LONG Tuan*

Hainan Bolian Rice Gene Technology Co., Ltd., Haikou 570203, Hainan, China

Abstract: Cytoplasmic male sterile (CMS) lines and photoperiod/thermo-sensitive genic male sterile (PTGMS) lines are widely used as female parents in the commercial production of rice hybrid seeds. However, both systems have their intrinsic defects such as low usage of germplasm resources and unstable sterility. Recessive genic male sterile (GMS) lines, which overcome the problems of CMS and PTGMS lines, have played a key role in the development of next generation technologies for rice hybrid seed production. In this study, a GMS mutant *ptc1-2* without pollen grains was identified from an irradiation-induced mutant library of 9311. Using a map-based cloning approach, a 259.37 kb deletion region was detected, which contained entire coding region of *PTC1* on chromosome 9. PCR co-segregation analysis showed that the male sterility was completely associated with the *ptc1-2* deletion region. The *ptc1-2* deletion locus was then introgressed into a PTGMS line C815S and a CMS maintainer line Wufeng B by marker-assisted backcrossing. Corresponding GMS lines C815G and Wufeng G were obtained at BC₃F₃ generation, which showed the phenotypical similarity to the C815S and Wufeng B lines, respectively. Combining ability tests revealed that C815G and Wufeng G had the same combining ability as C815S and the CMS line Wufeng A in conventional field, respectively. These results indicated that *ptc1-2* was a new allele of *PTC1*, which could be applied for breeding GMS lines and be the potential of GMS lines in rice hybrid seed production.

Keywords: rice; male sterile; *ptc1*; map-based cloning; backcrossing; combining ability test

水稻(*Oryza sativa* L.)是最重要的粮食作物之一, 世界上超过 1/2 的人口以稻米为主食。据预计, 到

本研究由中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室开放课题项目(20190203)资助。

This study was supported by the Open Project of State Key Laboratory of Rice Biology Foundation of China Rice Research Institute (20190203).

* 通信作者(Corresponding author): 龙湍, E-mail: longtuan2001@aliyun.com, Tel: 0898-66184571

第一作者联系方式: E-mail: 250864463@qq.com

Received (收稿日期): 2020-11-15; Accepted (接受日期): 2021-03-19; Published online (网络出版日期): 2021-04-06.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210406.1628.004.html>

2030 年水稻产量必须增加 40% 才能满足世界人口增长的需求^[1]。中国是稻米最大的生产国和消费国, 提高水稻产量是保障我国粮食安全和提高人民生活水平的基石^[2]。利用杂种优势是提高水稻产量的有效方法之一^[3], 杂交稻可以将水稻单产提高 10%~20%^[4]。目前, 我国的杂交水稻种植面积常年保持在 1.3×10^8 hm^2 以上。

我国杂交稻技术研究从 1960 年代开始, 共经历了 3 个阶段的发展^[5]。第一阶段是以胞质不育为核心的“三系法”杂交稻技术。该技术是基于 1970 年发现的“野败”型细胞质雄性不育, 它的不育性状是由线粒体基因突变引起, 可以由核恢复基因(*Rf*)恢复育性^[6-7], 因此可以构建一个包含不育系、保持系和恢复系的“三系”系统来实现杂交制种。1973 年, 我国在东南亚和国际水稻所引进的品种中筛选出了优良的恢复系古 154、泰引 1 号、IR24、IR665、桂选 7 号^[8], 标志着三系配套的成功^[9]。然而由于恢保关系的限制, 细胞质雄性不育的可利用种质资源仅为 5%, 亲本间遗传多样性小, 杂种优势的潜力无法得到充分利用^[5]。第二阶段是以光温敏不育系为核心的“两系法”杂交稻技术。两系法是利用其在一定的光温环境下植株表现出雄性不育, 而在另一光温环境下转变为正常可育的特性来分别实现杂交制种和自交繁殖。生产上常用的光温敏不育系的育性性状多由 *pms1*、*pms3* 和 *tms5* 控制^[10]。自 1985 培育出第一个两系不育系后, “两系法”杂交稻目前已占全国杂交水稻播种面积的 35% 左右, 成为水稻杂种优势利用的重要途径^[11]。“两系法”较“三系法”具有诸多优越性: 其一, 两系的不育性状为核基因控制, 不受恢保关系的限制, 因而选育新品种的几率更大。其二, 不育系可以一系两用, 减少育种工序和时间成本, 是快速繁育杂交水稻新品种的新途径。其三, 两系不育系有丰富的种质资源, 对培育多样化的杂交稻有极大的促进作用^[12]。然而, 环境变化引起的不育系育性转换将极大增加制种失败的风险。第三阶段将以隐性核雄性不育系为核心的“遗传智能化育种技术”^[13]。隐性核雄性不育的育性由核基因单独控制, 不受环境等外部因素的影响, 育性稳定, 可利用的种质资源广, 因此是杂交育种的理想材料。隐性核不育系无法通过常规方法大量繁殖, 在生产上的应用一直受到限制^[14]。直到最近, SPT 技术 (seed production technology) 的出现解决了隐性核不育系的繁殖问题, 使在水稻上大规模利用隐性核不

育系进行育种、制种成为可能^[15-16]。由于该技术将现代生物技术和传统杂交育种技术相结合, 这将是育种史上的一次巨大变革, 可能给水稻产量带来大幅度的提高。

目前在水稻中已有超过 20 个隐性核不育基因被克隆^[17], 其中调控从四分体时期到花粉成熟时期小孢子发育的基因被认为是最理想的隐性核不育基因。这一过程中, 绒毡层细胞起着决定性的作用。水稻中绒毡层的早期发育受 Undeveloped Tapetum1 (*UDT1*) 基因调控^[18], 它是一种 loop-helix-loop (bHLH) 转录因子, 在 *udt1* 突变体中, 绒毡层降解延迟, 导致小孢子败育。最近发现另一个 bHLH 因子 TDR, 它是绒毡层程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 的调控基因, 该基因的突变使绒毡层的 PCD 启动延迟, 花粉壁因无法获得前体物质而形成受阻^[19-20]。在拟南芥中, *TDR* 的直系同源基因 *AMS* 同样具有调控绒毡层 PCD 的功能^[21]。Zhang 等^[22]研究发现 TDR 还能与 *EAT1* 互作, 两者共同调控 PCD 的过程。此外, Huang 等^[23]克隆了一个 *PTC1* 基因, 它编码一个 679 个氨基酸的 PHD 锌指蛋白, 是绒毡层 PCD 的关键基因。*PTC1* (*OsMS1*) 蛋白还能够与 *OsMADS15* 和 *TIP2* 蛋白互作, 并通过 *TIP2* 调控 *EAT1* 基因的表达, 进而调控绒毡层的 PCD 过程^[24]。在 *PTC1* 的缺失突变体植株中, 绒毡层细胞无限制分裂及增大, 导致绒毡层细胞降解延迟, 乌氏体形成异常, 花粉壁发育缺陷, 从而引起完全雄性不育。

除了雄性育性性状外, 杂种优势潜力也是评价一个不育系优劣的重要标准。杂种优势是子一代表现出超越双亲平均值或高于任一亲本的现象^[25], 而有研究表明光温敏不育基因 *tms5* 就是一个杂种优势的 QTL 位点^[26]。利用隐性核不育基因替换光温敏不育基因或胞质不育基因后, 新不育系是否能保持原不育系的配合力水平, 目前尚无报道。为了调查不育基因对不育系配合力的影响, 本研究首先筛选并鉴定了一个大片段缺失型的新 *PTC1* 等位突变位点 *ptc1-2*, 然后将该突变位点导入优良的两系不育系 C815S 和三系保持系五丰 B 中获得了相应的隐性核不育系。对 F_1 表型的分析表明隐性核不育系与相应的两系或三系不育系具有相似水平的配合力。研究结果显示了隐性核不育系用于杂交水稻育制种的可行性, *ptc1-2* 的克隆也为隐性核不育系的创制提供了新的基因和材料资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

ptc1-2 突变体是通过 Co^{60} 辐射诱变籼稻 9311 (*Oryza sativa indica* 9311) 获得^[27]。籼稻品种明恢 63 和 9311 用于构建和 *ptc1-2* 的 F_2 定位群体。两系不育系 C815S 和三系保持系五丰 B 作为轮回亲本, 构建带有 *ptc1-2* 位点的核不育系。R524、R329、R315、R9773、R9103、R730、华占、R6-7、R809、R5431、R51084、R177、海恢 9380、福丰 1658、岳恢 9113 等 15 个材料作为父本, 用于配制杂交种。以上材料由海南波莲水稻基因科技有限公司从相应材料选育单位引进。

1.2 突变体筛选和表型鉴定

2013 年 11 月于海南临高播种 9311 突变体库中的 M_2 家系共计 3617 份, 在盛花期筛选花药异常株系, 取其小花在体式显微镜下仔细观察花的各部分结构, 并用碘-碘化钾溶液(0.6% KI, 0.3% I_2) 鉴定花粉的育性, 以野生型 9311 作为对照。对于花粉碘染显示完全不育的家系, 在田间观察突变体与野生型的株高、穗长、花期、叶色等农艺性状并照相记录, 对突变体材料套袋自交, 并与明恢 63 杂交, 统计其结实情况。

1.3 遗传和定位分析

2015 年 10 月在海南临高用 9311 和明恢 63 作父本分别与 *ptc1-2* 杂交。2016 年 2 月在临高种植 F_1 并观察其表型, 分别混收 2 个组合 F_1 的自交种。2016 年 7 月在临高种植 2 个 F_2 群体, 并统计 2 个群体中雄性不育株与正常植株的分离情况。使用明恢 63/*ptc1-2* 群体的 458 株 F_2 植株, 根据 Michelmore 等^[28] 的 BSA (bulked segregation analysis) 法进行基因定

位。用于检测分子标记的 PCR 反应程序为: 94 变性 5 min, 95 变性 20 s, 55 复性 20 s, 72 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72 补充延伸 5 min。PCR 产物经 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 1% AgNO_3 染色 10 min, 在 0.5% 甲醛和 2% NaOH 混合液中显影后照相读带。

1.4 突变位点的克隆与验证

根据定位结果, 参考 ASM465v1 (http://plants.ensembl.org/Oryza_indica/Info/Index) 版本的 9311 基因组序列, 在连锁区段开发分子标记精细定位突变位点。参照刘耀光等^[29] 的侧翼序列分离方法分离突变位点序列, 根据突变位点序列设计共分离标记, 并用 F_2 定位群体进行共分离验证。

用于侧翼序列分离的 PCR 反应分 3 步进行: 第一步, 使用引物对 1664sp1_F 和 1664AC1_R 扩增突变体基因组 DNA, 反应程序为: 93 预热 2 min, 95 变性 1 min; 94 变性 30 s, 60 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 10 个循环; 94 变性 30 s, 20 复性 2 min, 72 延伸 3 min; 94 变性 20 s, 58 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 25 个循环; 72 延伸 5 min。第二步, 使用引物对 1664sp2_F 和 1664AD1_R 扩增第一步产物的 40 倍稀释液, 反应程序为: 94 变性 20 s, 65 复性 1 min, 72 延伸 3 min; 94 变性 20 s, 68 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 94 变性 20 s, 68 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 94 变性 20 s, 50 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 13 个循环; 72 延伸 5 min。第三步, 使用引物对 1664sp3_F 和 1664AD2_R 扩增第二步产物的 10 倍稀释液, 反应程序为: 94 变性 20 s, 68 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 94 变性 20 s, 68 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 94 变性 20 s, 50 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 6~7 个循环; 72 补充延伸 5 min。

表 1 本研究所用的部分引物

Table 1 Partial list of the primers used in this study

序号 No.	标记/基因名称 Marker/gene name	上游引物序列 Forward primer (5'-3')	下游引物序列 Reverse primer (5'-3')	扩增产物长度 Length of amplified products (bp)	用途 Purpose
1	RM7039	GCACATTTGCCATTCTACCG	GCCTTCCAGTGAGGTGACTC	168	定位 Mapping
2	RM257	CAGTTCGAGCAAGAGTACTC	GGATCGGACGTGGCATATG	147	定位 Mapping
3	D9.168	CAATGTAAAAAGTGATGGGGTC	GGGAGAGAGTGAGAGAATAGAG	171	定位 Mapping
4	D3102	ATCTCGCAGTTTACATGCAG	ACGGAAATAAAATTCAGTTGGT	450	定位 Mapping
5	D3676	ATACTTATTGCGTTTCATGGTCA	CTTGAATGGACTCGACGCTA	462	定位 Mapping
6	D5146	ATACACCAATGCCTAGCGGAA	CTCTCCCTCGGTGACCAGA	492	定位 Mapping
7	D461	CTATGTCATCAACTGCGTGCC	ATTAGTTCGTTGCCAACTCG	454	定位 Mapping
8	D27560	ACATCAGGTTTCATCACGGAGC	GTCCCCACCTTCGTCCACT	601	定位 Mapping
9	D27420	CATTCCAGAGCATATTGAAACGA	ATTTACATCCATGACCCGTCT	527	定位 Mapping
10	D27580	TGGTTCATCGCTCTTCTTCGTT	CATGCTGCCTCCATACGGGAA	606	定位 Mapping

(续表 1)

序号 No.	标记/基因名称 Marker/gene name	上游引物序列 Forward primer (5'-3')	下游引物序列 Reverse primer (5'-3')	扩增产物长度 Length of amplified products (bp)	用途 Purpose
11	D27590	CTTTACCTATGTTCAAGCCTTCG	CCTAACAAGGTCAGACGCATC	735	定位 Mapping
12	D27650	CTCTTGTTGTTCTTCATCGTCCT	CATGCACCAGCAGCAACCA	451	定位 Mapping
13	D27820	ATGCGAGTCTATAAATTGCACCT	GTCCATCAGCTCCGTCGAGA	468	定位 Mapping
14	1664SP1	GCACACTGCACGGCGACGTTTAGG	—	—	侧翼序列分离 Isolating flank- ing sequences
15	1664SP2	ACGATGGACTCCAGTCTGGCTGCC GTGGGAATTAGAGCAT	—	—	侧翼序列分离 Isolating flank- ing sequences
16	1664SP3	CCCTCCAGGAGATTGTCTAAAATTG ACTTT	—	—	侧翼序列分离 Isolating flank- ing sequences
17	1664F1	CATCTCGCAGTTTACATGCAG	—	—	<i>ptcl-2</i> 标记 <i>ptcl-2</i> markers
18	1664R1	—	AGTCTACTCGAGCTACTACCG	—	<i>ptcl-2</i> 标记 <i>ptcl-2</i> markers
19	1664R2	—	CCATCTGAAACTAGTACTCCCA	—	<i>ptcl-2</i> 标记 <i>ptcl-2</i> markers
20	Tms5	ATCCCACAAATCCTTTAGCA	CCGTTATAGATAGACCCGAGA	RsaI/329/414	tms5 标记 tms5 markers

1.5 *ptcl-2* 核不育系的获得

选用优良的两系不育系 C815S、三系保持系五丰 B 作为母本, 与 *ptcl-2* 的杂合株杂交, 用突变体特异的分子标记(1664F1、1664R1 和 1664R2)筛选出突变位点杂合型的 F₁, 种植 F₁ 并连续回交 3 次。每次先用突变体特异标记和 *tms5* 的功能标记^[30]筛选 2 位点为杂合型的株系, 再用多态标记筛选回复率高的株系进入下一轮回交。将获得的 BC₃F₁ 自交, 用突变体特异标记和 *tms5* 的功能标记筛选 BC₃F₂ 植株, 其中只含有纯合 *ptcl-2* 突变位点且不含有 *tms5* 位点的单株, 即为相应的 *ptcl-2* 核不育系, 分别命名为 C815G 和五丰 G。观察 C815G、五丰 G、C815S 和五丰 A 的农艺性状, 并照相记录, 用碘-碘化钾分析花粉育性情况。调查植株的株高、抽穗期、穗粒数、穗长、粒长和粒宽, 参照 Griffing 等^[31]的显著性分析方法, 分析 C815G 和 C815S, 五丰 G 和五丰 A 在这 6 个农艺性状上的差异。

1.6 杂交种配制

2018 年夏在临高, 以 C815G、五丰 G、C815S 和五丰 A 为母本, R524、R329、R315、R9773、R9103、R730、华占、R6-7、R809、R5431、R51084、R177、海恢 9380、福丰 1658 和岳恢 9113 为父本, 根据不完全双列杂交(North Carolina mating design II, NCII)的方法配制杂交组合。

1.7 配合力分析

2019 年春, 将配制的 60 个杂交组合种植于海南临高基地(抽穗期间日均温 26~33 ℃, 日照时长 13.1 h)的 2 个测试点, 按随机区组试验设计, 每点重复 2 次。每个组合种植 5 行, 每行 7 株, 单株栽植, 株行距为 15 cm × 20 cm。在开始抽穗后, 调查抽穗期; 在黄熟期, 随机选取中间 3 株调查总分蘖数、株高、穗长(每株测量 5 穗)。收取 3~5 株的种子, 自然干燥后测量粒长、粒宽、穗粒数、结实率、千粒重、单株产量。统计由同一母本配制的杂交组合在各个农艺性状的平均值, 分析不同母本所配制的杂交组合的表型差异。参考黄远樟等^[32]的方法分析一般配合力和特殊配合力, 用 DPS 软件分析 2 套 NCII 组合的配合力情况^[33], 根据 Griffing 等^[31]的表型变异方差公式: $\delta^2_P = \delta^2_G + \delta^2_E$ 估算父母本对组合间表型变异的贡献率。

2 结果与分析

2.1 突变体表型

从辐射突变体库中 1664 号家系的 M₂ 代群体中找到 4 株雄性不育突变体, 将其命名为 *ptcl-2*。比较 *ptcl-2* 与野生型 9311 的株高、穗长、叶色、抽穗期等农艺性状, 发现均无显著差别(图 1-A, B)。解剖小花观察可见, *ptcl-2* 的花药明显变小、变白(图 1-C)。用碘-碘化钾将花药染色后在显微镜下观察, 野生型

的花粉粒被染成深紫色(图 1-D), 而 *ptcl-2* 观察不到花粉颗粒(图 1-E)。突变体在套袋自交情况下不结实, 而在作为母本与明恢 63 和 9311 杂交时能正常结实, 说明 *ptcl-2* 突变体是雄性完全不育突变体。2018 年冬, 在海南陵水鉴定了 *ptcl-2* 突变体的温敏特性, 结果显示 *ptcl-2* 在低温下无法恢复育性, 表明该突变体不受光温环境的影响, 为隐性核不育突变体。

2.2 *ptcl-2* 的定位

ptcl-2 突变体与野生型 9311、明恢 63 杂交所获得的所有 F_1 植株正常可育, 而 F_2 群体中可观察到育性分离。其中 *ptcl-2*/9311 的 F_2 群体中不育株与可育株分别为 92 株、312 株, *ptcl-2*/明恢 63 的 F_2 群体中不育株与可育株分别为 107 株、351 株。卡方检测表明, 2 个群体中不育株与正常株的比例都符合 1:3 的分离比(表 2), *ptcl-2* 突变体表型由核隐性单基因控制。

从 400 对 SSR 或 InDel 标记中筛选到 169 对在 9311 和明恢 63 之间有多态的标记, 从中选取均匀分布于水稻 12 条染色体上的 129 对多态标记分别分析 *ptcl-2*/明恢 63 群体中突变体和正常株的 DNA 混合池, 获得位于 9 号染色体上的 2 个与不育表型紧密连锁的标记 RM7039、RM257(图 2-A)。用 RM7039 和 RM257 标记分别扩增 50 个突变单株, 各检测到 8 个和 5 个交换单株(图 2-B), 进一步证实 *ptcl-2* 就定

位于这一区段内。然而, 使用位于 RM7039 和 RM257 之间的标记 D9.168 扩增这 50 个单株时, 没有条带扩增出来(图 2-B)。

图 1 *ptcl-2* 突变体及野生型 9311 的表型

Fig. 1 Phenotypes of the *ptcl-2* mutant and wild type plants

A: 灌浆期野生型 9311 和突变体 *ptcl-2* 的植株; B: 蜡熟期野生型 9311 和突变体 *ptcl-2* 的穗; C: 野生型 9311 和 *ptcl-2* 突变体的花器官; D: 野生型 9311 的花粉碘染; E: *ptcl-2* 突变体植株的花粉碘染。标尺: 15 cm (A); 3 cm (B); 2 mm (C); 150 μ m (D)。
A: plants of 9311 and *ptcl-2* mutant at filling stage; B: panicles of 9311 and *ptcl-2* mutant at ripening stage; C: floral organs of 9311 and *ptcl-2* mutant; D: pollen grains of 9311; E: pollen grains of *ptcl-2* mutant. Scale bars: 15 cm (A); 3 cm (B); 2 mm (C); 150 μ m (D).

图 2 *ptcl-2* 的图位克隆

Fig. 2 Map-based cloning of *ptcl-2*

A: *ptcl-2* 位点粗定位在 9 号染色体长臂的 RM7039 和 RM257 两个标记间; B: *ptcl-2* 基因精细定位至 D3102 和 D3676 之间, 物理距离为 573 bp; C: *ptcl-2* 位点包含从第 15,324,556 bp 到第 15,583,926 bp 共 259,370 bp 缺失, 该缺失片段包含整个 *PTC1* 基因。

A: the *ptcl-2* locus was first mapped to an interval between RM7039 and RM257 on the long arm of chromosome 9; B: *ptcl-2* was fine mapped to an interval of 573 base pairs between D1380 and D3676; C: the *ptcl-2* locus consisted of a 259,370 base-pair deletion from position 15,324,556 base-pair to position 15,583,926 base-pair. The deletion fragment contained the entire coding region of *PTC1*.

表 2 *ptc1-2* 突变体的遗传分析
Table 2 Genetic analysis of the *ptc1-2* mutant

组合 Cross	F ₁ 结实率 Seed-setting rate of F ₁ (%)	F ₂		$\chi^2_{(1:3)}$	$\chi^2_{0.05}$
		野生型植株数	突变体植株数		
		No. of wild-type plants	No. of mutant plants		
<i>ptc1-2</i> /9311	89.2	312	92	0.953	3.841
<i>ptc1-2</i> /明恢 63 <i>ptc1-2</i> /Minghui 63	88.1	351	107	0.570	3.841

2.3 突变位点序列克隆及验证

根据 9311 基因组序列, 在标记 D9.168 附近开发了 10 个新标记, 并用 50 个突变单株分析这些标记的扩增情况。其中标记 D27420、D27560、D461、D3102 能扩增出条带, 而标记 D3676、D5146、D27580、D27590、D27650、D27820 不能扩增出条带, 推测可能存在一个大片段缺失。标记 D3102 和标记 D3676 之间的物理距离为 573 bp (图 2-B)。在标记 D3102 的上游设计 3 条热不对称 PCR 特异引物(表 1), 随机引物序列参照刘耀光等^[29]设计。使用热不对称 PCR 经过 2 轮扩增后获得部分较亮的条带(图 3-A), 条带经测序分析后发现突变体在 9 号染色体第 15,324,556 位碱基到第 15,583,926 位碱基处存在 259,370 bp 的碱基缺失。该缺失片段内包含 19 个完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其中一个 ORF 为 *PTC1* 基因(图 2-C)。故将该突变位点命名为 *ptc1-2*。

根据缺失序列, 设计了一组特异的三引物 (1664F1, 1664R1, 1664R2) 标记(图 2-C)。使用该标记对 *ptc1-2*/明恢 63 的 F₂ 分离群体进行 PCR 扩增, 结

果显示所有雄性不育表型的 F₂ 植株扩增出的产物均为 546 bp, 表明发生了 259,370 bp 片段的纯合缺失。而表型正常的 F₂ 植株扩增出的产物均为 811 bp, 或 546 bp 和 811 bp 两种带型(图 3-B), 表明不存在 259,370 bp 片段的缺失或只有一条染色体带有 259,370 bp 片段的缺失。这个结果表明 259,370 bp 片段的缺失与不育表型共分离。

2.4 *ptc1-2* 核不育系的转育

为了分析隐性核不育基因对杂种优势的影响, 本研究以 *ptc1-2* 为供体, 通过回交转育的方法将 *ptc1-2* 位点导入到 C815S 和五丰 B 中, 分别得到 *ptc1-2* 的核不育系 C815G 和五丰 G。在 C815G 和五丰 G 中, *tms5* 位点被剔除。如图 4 所示, C815G 与 C815S (图 4-A~C), 以及五丰 G 和五丰 A (图 4-F~H) 的株高、穗长、叶色、抽穗期、小穗、小花等农艺性状均无明显差别。统计分析显示, C815G 和 C815S, 五丰 G 和五丰 A 在株高、抽穗期、穗粒数、穗长、粒长和粒宽等性状上均无显著差异(表 3)。值得注意的是 C815S (图 4-D)、C815G (图 4-E)

图 3 *ptc1-2* 位点侧翼序列的分离及共分离分析

Fig. 3 Isolation of sequences flanking the *ptc1-2* locus and co-segregation analysis

A: *ptc1-2* 位点两侧基因组序列分离第 2 轮 TAIL-PCR 扩增结果; B: *ptc1-2* 突变体的共分离验证。雄性不育表型的 F₂ 植株扩增出的产物长 546 bp, 而表型正常的 F₂ 植株扩增出的产物长 811 bp 或同时有 546 bp 和 811 bp 两条带。M 为 D2000 marker。
A: the second round of TAIL-PCR results for isolation of genomic sequences flanking the *ptc1-2* locus; B: co-segregation analysis of the *ptc1-2* locus with the male sterile phenotype. All PCR products of F₂ sterile plants were 546 bp in length. The size of PCR products of F₂ fertile plants was either 811 bp, or 546 bp, and 811 bp. M: DNA 2000 bp marker.

和五丰 G (图 4-J)均为无花粉型不育系, 五丰 A (图 4-I)为花粉败育型不育系。用 182 对多态标记检测 C815G 和五丰 G 的遗传背景, 回复率分别达到了 95.4%、96.7%。

2.5 核不育系的配合力分析

为了分析转育后不育系的配合力是否发生了改

变, 用 C815G、C815S、及五丰 G 和五丰 A 分别作为母本与 15 个测试父本, 按照 NCII 设计进行配组, 获得 2 套 NCII 组合。对这 2 个 NCII 群体进行 10 个农艺性状的表型考察及配合力分析, 结果显示, 除株高外, 2 对母本配制的杂交组合间表型没有显著差异(表 4)。但值得注意的是, 个别父本配制的杂交组合结实

图 4 C815G 和五丰 G 的表型

Fig. 4 Phenotypes of C815G and Wufeng G

A: 抽穗期 C815S 和 C815G 的植株; B: C815S 和 C815G 的小穗; C: C815S 和 C815G 花器官; D: C815S 的花粉碘染; E: C815G 的花粉碘染; F: 抽穗期五丰 A 和五丰 G 的植株; G: 五丰 A 和五丰 G 的小穗; H: 五丰 A 和五丰 G 花器官; I: 五丰 A 的花粉碘染; J: 五丰 G 的花粉碘染。标尺: 10 cm (A, F); 0.5 cm (B, C, G, H); 200 μ m (D, E, I, J)。

A: phenotypes of C815S and C815G plants at heading stage; B: spikelets of C815S and C815G; C: floral organs of C815S and C815G; D: pollen grains of C815S; E: pollen grains of C815G; F: phenotypes of Wufeng A and Wufeng G plants at heading stage; G: spikelets of Wufeng A and Wufeng G; H: floral organs of Wufeng A and Wufeng G; I: pollen grains of Wufeng A; J: pollen grains of Wufeng G. Scale bars: 10 cm (A, F); 0.5 cm (B, C, G, H); 200 μ m (D, E, I, J).

表 3 C815S、C815G、五丰 A 和五丰 G 的农艺性状分析

Table 3 Agronomic traits of C815S, C815G, Wufeng A, and Wufeng G

性状 Trait	C815S	C815G	五丰 A Wufeng A	五丰 G Wufeng G
抽穗期 Heading date (d)	82.60 $\pm$ 0.47	81.60 $\pm$ 0.47	72.00 $\pm$ 0.81	71.60 $\pm$ 0.47
株高 Plant height (cm)	67.50 $\pm$ 1.75	70.60 $\pm$ 3.13	68.60 $\pm$ 1.02	72.30 $\pm$ 2.59
总分蘖数 Total tiller number	8.00 $\pm$ 0.81	8.30 $\pm$ 0.47	8.00 $\pm$ 0.81	8.30 $\pm$ 0.47
穗长 Panicle length (cm)	23.43 $\pm$ 0.16	22.96 $\pm$ 0.09	23.26 $\pm$ 0.12	23.83 $\pm$ 0.20
穗粒数 No.of spikelets per panicle	169.30 $\pm$ 4.10	167.60 $\pm$ 3.39	174.00 $\pm$ 4.08	180.00 $\pm$ 2.44
粒长 Grain length (mm)	8.64 $\pm$ 0.13	8.84 $\pm$ 0.08	8.88 $\pm$ 0.04	8.84 $\pm$ 0.10
粒宽 Grain width (mm)	2.76 $\pm$ 0.10	2.60 $\pm$ 0.06	2.78 $\pm$ 0.10	2.82 $\pm$ 0.07

率有较大提高,例如,五丰 A/R9773 的结实率只有 63.5%,而五丰 G/R9773 的结实率却提高到 92.9%。

方差分析结果如表 5 和表 6。除株高性状以外,母本间的差异对杂交组合其他 9 个性状的影响并不显著($P>0.05$),说明 C815G 和五丰 G 分别与不育系 C815S 和五丰 A 基本不存在差异。同时根据 NCII 的方差分析,本研究估算了父母本的表型贡献率,发现无论是在以 C815S 和 C815G 为母本配

制的组合中,还是在以五丰 A 和五丰 G 为母本配制的组合中,株高表型变异的主要提供者是父本,分别为 43.67%和 21.32%,而母本材料对株高表型的变异贡献仅占 4.68%和 11.80%。说明尽管母本间的差异显著影响配组材料间的株高表型,但其在决定表型变异程度上依然很小。综上,NCII 的方差分析说明,利用 *ptc1-2* 进行育性改良并未明显改变原有不育系的性状。

表 4 C815G 和五丰 G 配制的杂交组合的表型

Table 4 Phenotypes of hybrids using C815G or Wufeng G as maternal parents

性状 Trait	C815S/+	C815G/+	五丰 A/+ Wufeng A/+	五丰 G/+ Wufeng G/+
抽穗期 Heading date (d)	84.60±4.84	84.30±4.98	81.45±5.84	82.13±5.78
株高 Plant height (cm)	103.80±5.43	103.50±5.47	113.29±4.88	108.92±5.47*
总分蘖数 Total tiller number	12.69±1.55	12.96±1.03	11.13±1.22	11.42±1.21
穗长 Panicle length (cm)	23.15±0.62	23.23±0.89	23.18±1.12	23.29±0.97
穗粒数 No. of spikelets per panicle	186.61±16.36	186.45±15.42	201.75±24.63	196.96±18.33
结实率 Seed-setting rate (%)	83.90±4.70	83.92±3.72	87.83±5.21	88.38±4.79
粒长 Grain length (mm)	8.94±0.36	8.94±0.40	8.88±0.25	8.90±0.27
粒宽 Grain width (mm)	2.56±0.20	2.56±0.19	2.58±0.13	2.59±0.15
千粒重 1000-grain weight (g)	24.43±1.91	24.35±1.99	24.92±2.04	24.97±2.00
单株产量 Grain yield per plant (g)	52.44±9.03	53.93±9.27	54.05±9.24	51.75±5.04

*表示差异达到 0.05 显著水平; C815S/+, C815G/+, 五丰 A/+和五丰 G/+分别表示 C815S、C815G、五丰 A、五丰 G 配制的杂交组合。

* indicates significant differences at the 0.05 probability levels; C815S/+, C815G/+, Wufeng A/+, and Wufeng G/+ indicate the hybrids of C815S, C815G, Wufeng A, and Wufeng G, respectively.

表 5 C815S 和 C815G 的田间配合力方差分析

Table 5 Variance analysis of combining ability of C815S and C815G in fields

性状 Trait	变因 Variance					
	区组 Block	组合 Combination	父本 Male parent	母本 Female parent	父本×母本 Male × female	误差 Error
自由度 DF	3	29	14	1	14	87
抽穗期 Heading date	16.03**	99.92**	126.39	2.7	80.4**	1.4
株高 Plant height	128.76**	122.89**	208.11**	2.7**	46.25	26.8
总分蘖数 Total tiller number	5.34	7.23**	10.2*	2.13	4.64*	2.47
穗长 Panicle length	1.14	2.43**	2.58	0.18	2.43**	0.56
穗粒数 No. of spikelets perpanicle	462.34*	1046.13**	1018.12	0.71	1148.8**	142.64
结实率 Seed-setting rate	0.005*	0.004**	0.003	0.001	0.004**	0.001
粒长 Grain length	0.03	0.59**	0.54	0.0007	0.69**	0.03
粒宽 Grain width	0.02	0.16**	0.15	0.0001	0.18**	0.01
千粒重 1000-grain weight	0.24	15.82**	21.19*	0.23	11.56**	0.3
单株产量 Grain yield per plant	1279.36**	348.89**	486.62*	66.11	231.37**	37.54

**、*分别表示差异达到 0.01 和 0.05 显著水平。

** and * indicate significant differences at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

表 6 五丰 A 和五丰 G 的田间配合力方差分析
Table 6 Variance analysis of combining ability of Wufeng A and Wufeng G in fields

性状 Trait	变因 Variance					
	区组 Block	组合 Combination	父本 Male parent	母本 Female parent	父本×母本 Male × female	误差 Error
自由度 DF	3	29	14	1	14	87
抽穗期 Heading date	39.56**	140.12**	170.42	14.01	118.83**	3.24
株高 Plant height	395.38**	130.89**	178.40**	571.60**	51.89**	50.23
总分蘖数 Total tiller number	9.95**	6.23**	6.85	2.64	5.86**	2.11
穗长 Panicle length	5.07**	4.55**	4.83	0.37	4.57**	0.78
穗粒数 No. of spikelets per panicle	702.16**	1973.93**	2169.24	686.89	1870.55**	136.50
结实率 Seed-setting rate	0.003**	0.01**	0.01	0.001	0.01**	0.001
粒长 Grain length	0.59**	0.29**	0.29	0.01	0.30**	0.07
粒宽 Grain width	0.10**	0.08**	0.05	0.01	0.13	0.02
千粒重 1000-grain weight	1.14	16.88**	21.29	0.08	13.68**	0.57
单株产量 Grain yield per plant	500.55**	234.86**	256.85	158.86	218.30**	70.25

**和*分别表示差异达到 0.01 和 0.05 显著水平。
** and * indicate significant differences at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

此外,本研究计算了 C815S 与 C815G, 五丰 A 与五丰 G 的一般配合力相对效应值,如表 7 所示。C815S 与 C815G、五丰 A 与五丰 G 的一般配合力相对效应值在所有性状上差异都不大。上述结果表明,母本的一般配合力相似。

3 讨论

利用图位克隆的方法,本研究从 9311 辐射诱发突变体 *ptc1-2* 中克隆了一个新的 *PTC1* 突变位点。该突变位点是一个 259.37 kb 的大片段缺失,包括 *PTC1* 在内的 19 个 ORF 均位于该缺失区段内。前人的报道中,*PTC1* 编码一个 PHD 锌指蛋白,参与花粉外壁的形成和绒毡层的发育。*PTC1* 突变后造成水稻雄性不育,但对其他农艺性状没有明显影响^[22]。因

此推测 *ptc1-2* 的雄性不育表型是由 *PTC1* 缺失造成。除 *PTC1* 外,另外 18 个基因的缺失并未造成明显突变表型,表明这些基因可能为水稻的非必需基因。Wang 等^[34]分析 3010 份水稻品种重测序数据发现,有 37.9% 的基因为非必需基因,这些基因通常会在不同个体中出现或缺失,但不影响个体的生长发育。因此,*ptc1-2* 的大片段缺失可能并不影响其在生产上应用。

配合力是衡量一个材料是否具有杂种优势的重要指标,它的测定方法包括双列杂交法、顶交法和多系测交法,其中不完全双列杂交法(NCII)是不育系配合力测定的有效方法^[35]。为了探究核不育系对杂种优势的影响,本研究设计了 2 组 NCII 交配试验,分别分析了 C815G 与 C815S, 五丰 G 与五丰 A 的配

表 7 田间一般配合力相对效应值
Table 7 Relative effect values of general combining ability in fields

性状 Trait	C815S	C815G	五丰 A Wufeng A	五丰 G Wufeng G
抽穗期 Heading date	0.1776	-0.1776	-0.4177	0.4177
株高 Plant height	0.1447	-0.1447	1.9643	-1.9643
总分蘖数 Total tiller number	-1.0399	1.0399	-0.2967	0.2967
穗长 Panicle length	-0.1653	0.1653	-0.2403	0.2403
穗粒数 No. of spikelets per panicle	0.0411	-0.0411	1.2001	-1.2001
结实率 Seed-setting rate	0.0795	-0.0795	-0.3093	0.3093
粒长 Grain length	-0.0280	0.0280	-0.0984	0.0984
粒宽 Grain width	0.0391	-0.0391	-0.2902	0.2902
千粒重 1000-grain weight	0.1784	-0.1784	-0.1012	0.1012
单株产量 Grain yield per plant	-1.4929	1.4929	2.1750	-2.1750

合力情况。2 组结果均显示除株高 1 个性状外, 其它 9 个性状在母本间的差异均不显著, 表明不育系改良前后配合力水平相似。为了确定杂交组合中株高差异的主要来源, 本研究估算了 2 组群体中父母本对株高变异的贡献率, 结果显示母本材料对株高表型的变异贡献仅占 4.68% 和 11.80%, 而父本贡献率达到 43.67% 和 21.32%, 表明组合间的显著差异主要来源于父本。本研究使用了 15 个不同来源的恢复系作为测试亲本, 其遗传基础广泛, 更能有效降低与被测亲本间的互作效应, 从而提高配合力测定水平^[36]。

目前杂交水稻生产中常用的三系和两系不育系都有缺陷, 如育性不稳定, 可利用种质资源狭小, 制种成本高等。发展新的育种、制种技术成为杂交水稻产业发展的迫切需求^[37]。隐性核不育系具有恢复基因广泛存在, 育性稳定等特点, 可以很好的克服三系和两系不育系的缺点^[14-15]。在本研究中五丰 G 与五丰 A 配制的杂交组合的平均结实率虽然没有显著差异, 但个别组合如五丰 G/R9773 的结实率比五丰 A/R9773 的结实率提高了近 30%。一个可能的解释是使用 *ptcl-2* 位点替换三系不育系的核质互作不育系统后, 解除了恢复系和不育系的恢保关系限制, 从而提高了 F₁ 代的结实率。但考虑到五丰 G 的转育过程, 五丰 G 遗传背景中不可避免的会带有少量 9311 的遗传背景, 因此也不能完全排除少量 9311 遗传背景的导入对结实率产生了影响。鲍海滢等^[38]利用 100 个 AFLP 标记分析 3 个中国春小麦的 BC₉ 近等基因系, 发现它们仍有约 0.22% 的背景差异, 表明遗传差异仍然会存在于表型十分相似的植株里。使用更多的三系恢复系与五丰 G 和五丰 A 配组进行结实率分析, 将进一步验证隐性核不育系在大幅增加恢复基因来源和提高种质资源利用率方面的优势。此外, 五丰 G 为无花粉型不育, 比碘败型的五丰 A 不育更彻底, 同时育性也不受光温环境的影响, 显示出隐性核不育系在杂交稻制种安全性方面的优势。

4 结论

本研究利用图位克隆的方法从一个籼稻 9311 辐射诱变突变体中鉴定了一个新的 *PTCL* 等位突变位点 *ptcl-2*。 *ptcl-2* 位点控制雄性不育表型, 不育性状不受光温环境影响, 也不影响水稻其他农艺性状。利用 *ptcl-2* 位点创制的隐性核不育系 C815G 和五丰 G 保持了相应三系和两系不育系的配合力, 显示了核

不育系具有与两系和三系不育系相当的杂种优势潜力。本研究为核不育系的利用提供了理论依据, 也提供了新的基因和材料资源。

致谢: 中国科学院亚热带农业生态研究所孙亮副研究员给予本文细致的修改, 谨此致谢。

References

- [1] Khush G S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol Biol*, 2005, 59: 1–6.
- [2] 余四斌, 熊银, 肖景华, 罗利军, 张启发. 杂交稻与绿色超级稻. *科学通报*, 2016, 61: 3797–3803.
Yu S B, Xiong Y, Xiao J H, Luo L J, Zhang Q F. Hybrid rice and green super rice. *Chin Sci Bull*, 2016, 61: 3797–3803 (in Chinese).
- [3] Tester M, Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 2010, 327: 818–822.
- [4] Normile D. Agricultural research: reinventing rice to feed the world. *Science*, 2008, 321: 330–333.
- [5] Wang H, Deng X W. Development of the “Third-Generation” hybrid rice in China. *Genom Proteom Bioinf*, 2018, 16: 393–396.
- [6] Tang H, Luo D, Zhou D, Zhang Q, Tian D, Zheng X, Chen L, Liu Y G. The rice restorer *Rf4* for wild-abortive cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial-localized PPR protein that functions in reduction of *WA352* transcripts. *Mol Plant*, 2014, 7: 1497–1500.
- [7] Luo D, Xu H, Liu Z, Guo J, Li H, Chen L, Fang C, Zhang Q, Bai M, Yao N, Wu H, Wu H, Ji C, Zheng H, Chen Y, Ye S, Li X, Zhao X, Li R, Liu Y G. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nat Genet*, 2013, 45: 573–577.
- [8] 任光俊, 颜龙安, 谢华安. 三系杂交水稻育种研究的回顾与展望. *科学通报*, 2016, 61: 3748–3760.
Ren G J, Yan L A, Xie H A. Retrospective and perspective on indica three-line hybrid rice breeding research in China. *Chin Sci Bull*, 2016, 61: 3748–3760 (in Chinese).
- [9] 袁隆平. 水稻的雄性不孕性. *科学通报*, 1966, 17(4): 185–188.
Yuan L P. Hybrid rice and green super rice. *Chin Sci Bull*, 1966, 17(4): 185–188 (in Chinese).
- [10] Fan Y, Zhang Q. Genetic and molecular characterization of photoperiod and thermo-sensitive male sterility in rice. *Plant Reprod*, 2017, 31: 1–12.
- [11] Hu Z, Tian Y, Xu Q. Review of extension and analysis on current status of hybrid rice in China. *Hybrid Rice*, 2016, 31: 1–8.
- [12] 袁隆平. 两系法杂交水稻研究的进展. *中国农业科学*, 1990, 23(3): 1–6.
Yuan L P. Progress of two-line system hybrid rice breeding. *Sci Agric Sin*, 1990, 23(3): 1–6 (in Chinese with English abstract).
- [13] 袁隆平. 第三代杂交水稻初步研究成功. *科学通报*, 2016, 61: 3404–3404.
Yuan L P. Third-generation hybrid rice preliminary research success. *Chin Sci Bull*, 2016, 61: 3404–3404 (in Chinese).
- [14] Wan X, Wu S, Li Z, Dong Z, An X, Ma B, Tian Y, Li J. Maize genic male-sterility genes and their applications in hybrid

- breeding: progress and perspectives. *Mol Plant*, 2019, 12: 321–342.
- [15] Wu Y, Fox T W, Trimnell M R, Wang L, Xu R, Cigan A M, Huffman G A, Garnaat C W, Hershey H, Albertsen M C. Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. *Plant Biotechnol J*, 2015, 14: 1–9.
- [16] Chang Z, Chen Z, Wang N, Xie G, Lu J, Yan W, Zhou J, Tang X, Deng X W. Construction of a male sterility system for hybrid rice breeding and seed production using a nuclear male sterility gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 14145–14150.
- [17] 马西青, 方才臣, 邓联武, 万向元. 水稻隐性核雄性不育基因研究进展及育种应用探讨. *中国水稻科学*, 2012, 26: 511–520.
- Ma X Q, Fang C C, Deng L W, Wan X Y. Research progress and breeding application of recessive genic male sterility genes in rice. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26: 511–520 (in Chinese with English abstract).
- [18] Jung K H, Han M J, Lee Y S, Kim Y W, Hwang I H, Kim M J, Kim Y K, Nahm B H, An G. Rice *Undeveloped Tapetum 1* is a major regulator of early tapetum development. *Plant Cell*, 2005, 17: 2705–2722.
- [19] Yang Z, Sun L, Zhang P, Zhang Y, Yu P, Liu L, Abbas A, Xiang X, Wu W, Zhan X, Cao L, Cheng S. *TDR INTERACTING PROTEIN 3*, encoding a PHD-finger transcription factor, regulates Ubisch bodies and pollen wall formation in rice. *Plant J*, 2019, 99: 844–861.
- [20] Li N, Zhang D S, Liu H S, Yin C S, Li X X, Liang W Q, Yuan Z, Xu B, Chu H W, Wang J, Wen T Q, Huang H, Luo D, Ma H, Zhang D B. The rice *Tapetum Degeneration Retardation* gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell*, 2006, 18: 2999–3014.
- [21] Han Y Y, Zhou H Y, Xu L, Liu X Y, Fan S X, Cao J S. The zinc-finger transcription factor *BcMF20* and its orthologs in Cruciferae which are required for pollen development. *Biochem Bioph Res Commun*, 2018, 503: 998–1003.
- [22] Niu N, Liang W, Yang X, Jin W, Wilson Z A, Hu J, Zhang D. *EAT1* promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. *Nat Commun*, 2013, 4: 1–11.
- [23] Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, Yang C, Liang W, Zong J, Wilson Z A, Zhang D. *PERSISTENT TAPETAL CELL 1* encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice. *Plant Physiol*, 2011, 156: 615–630.
- [24] Yang Z, Liu L, Sun L, Yu P, Zhang P, Abbas A, Xiang X, Wu W, Zhang Y, Cao L, Cheng S. *OsMSI* functions as a transcriptional activator to regulate programmed tapetum development and pollen exine formation in rice. *Plant Mol Biol*, 2019, 99: 175–191.
- [25] Springer N M, Stupar R M. Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than a whole? *Genome Res*, 2007, 17: 264–275.
- [26] Huang X, Yang S, Gong J, Zhao Q, Feng Q, Zhan Q, Zhao Y, Li W, Cheng B, Xia J, Chen N, Huang T, Zhang L, Fan D, Chen J, Zhou C, Lu Y, Weng Q, Han B. Genomic architecture of heterosis for yield traits in rice. *Nature*, 2016, 537: 629–633.
- [27] 龙湍, 安保光, 李新鹏, 张维, 李京琳, 杨瑶华, 曾翔, 吴永忠, 黄培劲. 籼稻 9311 辐射诱变突变体库的创建及其筛选. *中国水稻科学*, 2016, 30: 44–52.
- Long T, An B G, Li X P, Zhang W, Li J L, Yang Y H, Zeng X, Wu Y Z, Huang P J. Construction and screening of an irradiation-induced mutant library of *indica* rice 93-11. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30: 44–52 (in Chinese with English abstract).
- [28] Michelmores R. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annu Rev Phytopathol*, 1995, 33: 393–427.
- [29] Liu Y G, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *BioTechniques*, 2007, 43: 649–656.
- [30] 张华丽, 陈晓阳, 黄建中, 鄂志国, 龚俊义, 舒庆尧. 中国两系杂交水稻光温敏核不育基因的鉴定与演化分析. *中国农业科学*, 2015, 48: 1–9.
- Zhang H L, Chen X Y, Huang J Z, E Z G, Gong J Y, Shu Q Y. Identification and transition analysis of photo-/thermo-sensitive genic male sterile genes in two-line hybrid rice in China. *Sci Agric Sin*, 2015, 48: 1–9 (in Chinese with English abstract).
- [31] Griffing B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust J Biol Sci*, 1956, 9: 463–493.
- [32] 黄远樟, 刘来福. 作物数量遗传学基础六、配合力: 不完全双列杂交. *遗传*, 1980, 2(2): 45–48.
- Huang Y Z, Liu L F. The basis of quantitative genetics in crops. Combining ability: incomplete diallel cross. *Heredias*, 1980, 2(2): 45–48 (in Chinese).
- [33] Tang Q Y, Zhang C X. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci*, 2013, 20: 254–260.
- [34] Wang W, Mauleon R, Hu Z, Chebotarov D, Tai S, Wu Z, Li M, Zheng T, Fuentes R R, Zhang F, Mansueto L, Copetti D, Sanciango M, Palis K C, Xu J, Sun C, Fu B, Zhang H, Gao Y, Zhao X, Shen F, Cui X, Yu H, Li Z, Chen M, Detra J, Zhou Y, Zhang X, Zhao Y, Kudrna D, Wang C, Li R, Jia B, Lu J, He X, Dong Z, Xu J, Li Y, Wang M, Shi J, Li J, Zhang D, Lee S, Hu W, Poliakov A, Dubchak I, Ulat V J, Borja F N, Mendoza J R, Ali J, Li J, Gao Q, Niu Y, Yue Z, Naredo M E, Talag J, Wang X, Li J, Fang X, Yin Y, Glaszmann J C, Zhang J, Li J, Hamilton R S, Wing R A, Ruan J, Zhang G, Wei C, Alexandrov N, McNally K L, Li Z, Leung H. Genomic variation in 3,010 diverse accessions of Asian cultivated rice. *Nature*, 2018, 557(7703): 43–49.
- [35] Comstock R E, Robinson H F, Harvey P H. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. *Agron J*, 1949, 41: 360–367.
- [36] Matzinger D F. Comparison of three types of testers for the evaluation of inbred lines of corn. *Agron J*, 1953, 45: 493–495.
- [37] 邓兴旺, 王海洋, 唐晓艳, 周君莉, 陈浩东, 何光明, 陈良碧, 许智宏. 杂交水稻育种将迎来新时代. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43: 864–868.
- Deng X W, Wang H Y, Tang X Y, Zhou J L, Chen H D, He G H, Chen L B, Xu Z H. Hybrid rice breeding welcomes a new era of molecular crop design. *Sci Sin (Vitae)*, 2013, 43: 864–868 (in Chinese with English abstract).
- [38] 鲍海滢, 刘秉华, 王山荭, 杨丽, 夏兰芹. 矮败小麦近等基因系的分子检测. *作物学报*, 2001, 27: 541–543.
- Bao H Y, Liu B H, Wang S H, Yang L, Xia L Q. Molecular assessment of NILs of dwarfing sterile wheat. *Acta Agron Sin*, 2001, 27: 541–544 (in Chinese with English abstract).