水稻野败型细胞质雄性不育的发现利用与分子机理

陈乐天^{①②}, 刘耀光^{①*}

① 华南农业大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广州 510642;

② 华南农业大学生命科学学院, 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广州 510642

* 联系人, E-mail: ygliu@scau.edu.cn

2016-09-18 收稿, 2016-09-19 修回, 2016-09-19 接受, 2016-10-20 网络版发表

国家重点研究发展计划(2016YFD0100804, 2016YFD0100903)和国家自然科学基金(31471564, 31230052)资助

摘要 野败型细胞质雄性不育(CMS-WA)野生稻的发现和利用是实现杂交水稻“三系”配套育种和杂种优势利用的关键, 也是人类挖掘和利用野生生物种资源服务于农业生产的成功典范, 对粮食安全发挥了重要的作用. 本文回顾了野败型细胞质雄性不育野生稻的发现以及遗传育种研究和利用的历程, 重点介绍野败型细胞质雄性不育性及其恢复性的分子机理和起源进化研究的最新进展. 1970年, 袁隆平团队在海南发现了细胞质雄性不育野生稻. 随后我国许多遗传育种学家利用该材料为不育细胞质供体, 于20世纪70年代初育成了野败型细胞质雄性不育系, 完成了基于“三系”配套的杂交稻育种体系, 实现了杂交稻大规模商业化应用, 获得了显著的增产效果. 经过长期的研究, 我国科学家成功克隆了野败型细胞质雄性不育基因WA352和恢复基因Rf4, 阐明了WA352复杂的起源进化机制. 研究揭示了WA352蛋白通过与核基因表达的线粒体定位蛋白COX11相互作用, 诱导花药绒毡层异常降解和花粉不育, Rf4通过降低WA352转录本水平恢复育性, 阐明了植物CMS/Rf系统不同层次的核质互作控制雄性不育发生和育性恢复的分子作用机理. 本文还探讨了今后杂交稻育种发展的重点和方向.

关键词 杂交水稻, 杂种优势, 细胞质雄性不育, 野败型

水稻(*Oryza sativa* L.)是重要的粮食作物, 是世界约一半人口的主粮, 对全球粮食安全具有重要的作用^[1]. 杂交水稻生产技术是我国现代农业的一项重要成果, 为我国的粮食产量安全作出了重要贡献^[2]. 我国杂交稻生产技术从“三系法”到“两系法”, 一直处于国际领先水平^[1]. 杂交稻生产模式的突破, 得益于我国农业科学家对水稻雄性不育遗传材料的发现、研究和利用^[1,3].

植物雄性不育包括受核基因控制的核不育类型和受细胞质基因决定的细胞质不育类型^[4-6]. 核不育系难以高效繁殖, 因此在作物杂交种生产中难以利

用. 细胞质雄性不育只有在细胞核基因组携带无功能型恢复基因(隐性恢复基因)时才表现为雄性不育; 如果细胞核存在功能型恢复基因(显性恢复基因), 细胞质含有不育基因的植株(如杂种)则表现为雄性可育. 因此细胞质雄性不育也称为核质互作不育. 细胞质雄性不育系与含有正常细胞质且只携带隐性恢复基因的保持系杂交可以繁殖雄性不育系; 不育系与含有显性恢复基因的恢复系杂交获得育性恢复的杂种F₁种子. 自交作物水稻以细胞质雄性不育系、保持系和恢复系(即“三系”)配套生产杂交种子, 可高效地生产杂交种子, 降低种子成本, 保证种子纯度, 可利

引用格式: 陈乐天, 刘耀光. 水稻野败型细胞质雄性不育的发现利用与分子机理. 科学通报, 2016, 61: 3804-3812

Chen L T, Liu Y G. Discovery, utilization and molecular mechanisms of CMS-WA in rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 3804-3812, doi: 10.1360/N972016-01044

用杂种优势大幅度提高产量,因而在农业生产中广泛应用^[3]。根据不育细胞质的来源不同,已在杂交稻利用的细胞质雄性不育类型分为野败型(Wild Abortive type cytoplasmic male sterility, CMS-WA)、包台型(Boro II type cytoplasmic male sterility, CMS-BT)和红莲型(Hong-Lian type cytoplasmic male sterility, CMS-HL)^[5]。20世纪70年代初期,我国率先从普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)中发现野败型细胞质雄性不育材料,并用于育成“三系”杂交水稻和大面积推广,为我国水稻粮食增产做出了重要贡献。另一方面,植物核质互作雄性不育是基础生物学中研究细胞核基因与线粒体基因相互作用的理想模型^[6]。本文回顾了野败型细胞质雄性不育材料的发现和利用过程,介绍其分子遗传学研究进展,最后对“三系”杂交稻生产中存在的问题进行分析和展望。

1 雄性不育野生稻的发现

植物雄性不育是雄性器官不能产生正常功能的雄配子(花粉)的现象。雄性不育植物性不能自交繁殖,但由于其雌器官正常,因此雄性不育植株可以接受外源花粉受精结实,有利于异质基因的交流,扩大种群的遗传多样性。人们利用这一特性,实现农作物的杂交育种和杂种优势利用。因此,植物雄性不育性是杂种优势利用的遗传基础,在农业生产中有重要的利用价值。我国水稻雄性不育研究始于20世纪60年代。1964年,袁隆平在洞庭早粳品种中首先发现水稻雄性不育株,并于1966年4月在《科学通报》发表“水稻的雄性不孕性”一文^[7],开创了我国植物雄性不育和水稻杂种优势利用研究的先河,受到当时国家科学技术委员会(现国家科学技术部)的重视和支持。但洞庭早粳雄性不育材料为核不育类型,没有合适的方法高效繁殖不育系,因而无法用于杂交稻育种。1970年11月23日,湖南省安江农业学校袁隆平的助手李必湖和海南岛崖县(现三亚市)南红农场技术员冯克珊对农场附近水塘分布的普通野生稻进行观察,发现了一棵花药异常的植株。该野生稻不育株的花药瘦小发白,不开裂,花粉没有内含物。于是,袁隆平将其命名为“野败(wild abortive)”雄性不育株。“野败”雄性不育株的这一重要发现,为杂交稻的成功选育和生产利用找到了突破口,开创了“东方魔稻”的辉煌历史。因此,国内外把袁隆平称为“杂交水稻之父”。

2 水稻野败型细胞质雄性不育及其恢复性的利用

2.1 籼型水稻雄性不育系和恢复系的选育

1972年,水稻雄性不育和杂种优势利用研究被列为全国农林重大科研协作项目,由中国农业科学院和湖南省农业科学研究所(现湖南省农业科学院)牵头,在袁隆平的组织 and 指导下,全国有13个省区市参加开展了大协作,利用首个不育材料为细胞质供体,以回交方法育成了我国第一批半矮秆籼稻野败型细胞质雄性不育系和保持系。其中包括袁隆平团队育成的“二九南1号A”和颜龙安团队育成的“珍汕97A”和“二九矮4号A”。1973年,以“珍汕97A”和“二九矮4号A”和从国外引进品种中筛选到的恢复系“IR24”组配,育成了第一批强优势杂交组合“汕优2号”和“南优二号”,实现了籼型杂交水稻三系配套(图1)。1976年开始在全国推广基于野败型细胞质雄性不育与恢复性的三系杂交稻,20世纪80年代末起,杂交稻种植面积快速达到了全国水稻栽培面积的约50%,增产效果达到20%~30%,创造了粮食增产的奇迹^[1]。杂交水稻的培育成功,是农业生产和水稻育种史上的一次重大突破,创造了巨大的经济效益和社会效益。杂交水稻育种的成功打破了“自花授粉作物没有杂种优势”的传统观念,极大丰富了作物遗传育种的理论和实践,具有很高的学术价值。

我国的野败型杂交稻培育成功后,国内许多育种单位和国际水稻研究所以及美国、菲律宾、印度、越南等国的育种机构利用这些不育系材料进一步育

图1 “三系”材料的花药和花粉形态。野败型不育系的花药瘦小发白,花粉无淀粉和细胞内含物积累,呈不规则空泡状,不能被 I_2 -KI染色,属于典型败育。保持系和恢复系花药鲜黄色,饱满,花粉圆形,因淀粉积累能被 I_2 -KI染成紫黑色

Figure 1 Morphology of anther and pollens of the three-line system

出了大量的适应不同栽培地区的不育系. 这些不育系拥有共同来源的野败型雄性不育细胞质, 被统称为野败型雄性不育系. 随后, 我国育种家还以多个不同细胞质材料先后育成多种不育系, 如印水型、冈型、矮败型、D型、K型不育系, 但这些新不育系与野败型不育系具有相同的恢保关系^[8]. 近年来, 在基于光温敏雄性不育系的二系杂交有较大发展的情况下, 野败型雄性不育系仍然是杂交水稻生产中应用最为广泛的不育系类型.

2.2 粳型水稻雄性不育系和恢复系的选育

与籼型不育系相比, 粳型不育系的研究起步更早, 但生产应用却显得曲折困难. 1958年, 日本东北大学胜尾清(Kiyoshi Katsuo)教授发现中国红芒普通野生稻为母本与日本粳稻藤板5号杂交, 能产生雄性不育的细胞质^[9]. 而1960年, 日本琉球大学的育种家新城长友(Chou Shinjyo)以印度籼稻钦苏拉-包罗II(Chinsurah Boro II)为母本与粳稻台中65杂交, 培育出BT型(包台型)雄性不育的细胞质^[10].

1965年, 我国云南农业大学李铮友教授在云南保山的台北8号大田中发现水稻雄性不育株, 并用红帽缨水稻杂交转育, 1969年育成我国第一个滇I型粳稻细胞质雄性不育系; 1973年, 成功实现杂交粳稻“三系”配套^[11]. 1970年后, 滇I型不育系被全国各地引进并转育成了一批新不育系, 如辽宁的丰锦A、浙江台州的76-27A等^[12].

20世纪70年代以来, 我国许多育种家尝试把野败细胞质转移到粳稻不育系中, 实现粳稻杂种优势利用, 如采用核置换的方法育成了野败型粳稻“京引66”不育系^[13], 但CMS-WA粳型不育系存在闭颖、开花不集中、结实率低、恢复力弱、恢复源少等一系列问题而不能用于生产^[14]. 1972年中国农业科学院从日本引进BT型粳稻不育系台中65A, 此后国内多个单位利用该不育系进行杂交转育, 培育了BT型粳稻不育系达100多个. 然而, 限制粳型杂交稻应用的瓶颈在于大量测交实验中始终未能找到对粳型不育系的恢复系, 无法实现“三系”配套. 1975年, 我国杨振玉^[14]和祁正汉^[15]率先创建“籼粳架桥”制恢技术, 育成了含籼稻血缘和特征的高配合力的粳型恢复系C57(含有籼稻来源的恢复基因), 从而打开了粳型三系杂交稻生产应用的大门, 实现我国粳型杂交水稻三系配套. 利用湖南省农业科学院罗孝和培育的BT

型不育系黎明A与C57杂交, 育成了我国第一个用于生产的杂交粳稻组合黎优57.

目前, 由BT型和滇型不育系配组的粳型杂交稻与常规粳稻相比, 在产量上的杂种优势不够强, 优良的杂交组合少, 导致粳型杂交稻推广一直未能打开局面, 其种植面积不到5%的粳稻种植面积^[16].

3 野败型细胞质雄性不育性及其恢复性的遗传和分子机理研究

3.1 野败型细胞质雄性不育基因的克隆和机理研究

细胞质雄性不育基因符合母性遗传模式, 被认为是位于线粒体基因组中. 分离不育基因的策略可以像玉米T-型细胞质雄性不育蛋白URF13那样, 从蛋白水平比较CMS与可育材料间蛋白质组差异, 克隆相关CMS基因^[17]. 细胞质雄性不育基因其实广泛存在于植物当中, 但因为其细胞核中通常含有相应的恢复基因而不表现出不育特性. 因此, 也可以通过原生质体融合的核质交换或杂交把细胞质和核基因彼此分离形成核质杂种, 再比较不育材料和可育材料线粒体DNA差异, 来确定不育基因, 萝卜CMS-Ogu的不育基因*orf138*就是一个成功的典型案例^[18,19].

自CMS-WA发现以来, 人们在利用于杂交稻育种的同时, 也对其进行了大量的基础研究. 早期的研究主要在遗传学和细胞学层面. 研究明确CMS-WA的花粉因败育无淀粉积累, 不能被I₂-KI染色, 呈不规则典型败形态(图1). CMS-WA遗传上受母体基因型决定, 属于孢子体不育类型. 1987年, Mignouna等人^[20]首先发现野败不育系“珍汕97A”中含有1个特异大小为2.1 kb的类质粒DNA, 但不确定是否与不育有关. 多年来, 研究人员通过比较野败型不育系、保持系和恢复系的线粒体基因组片段的多态性来确定其不育基因, 但一直未能成功. 2002年, 第一个水稻线粒体基因组测序完成^[21]. Liu等人^[22]利用该序列信息, 通过一网打尽的“大包围”策略, 将490 kb的水稻线粒体基因组分成43个片段进行PCR扩增. 以这些片段作为探针, 对野败型不育系、保持系、恢复系进行Northern blotting分析, 寻找不同遗传材料线粒体基因组表达差异, 以查找CMS-WA候选基因, 发现了2个不育系特异表达的转录本. 进一步将候选基因与

线粒体定位信号融合构建转化载体,对水稻和拟南芥进行遗传转化证实,其中一个编码352个氨基酸的嵌合基因是导致CMS-WA不育表型的不育基因,并命名为WA352^[23]。WA352编码一个352个氨基酸具有3个跨膜区的跨膜蛋白,跨膜区是WA352蛋白产生对大肠杆菌毒性的必须区段,但不是导致雄性不育表型的关键序列^[23]。

通过对多种粳型不育系如印水型、冈型、矮败型、马协型、D型、K型等的线粒体序列分析表明,这些孢子体型不育系均含有相同的不育基因WA352^[23]。这一分子证据与这些粳型不育系具有相同的遗传恢复关系是符合的。

进一步研究发现,WA352是一个组成型表达mRNA的基因,但是其蛋白却特异性在花粉母细胞期的花药绒毡层积累。在花药正常发育过程中,绒毡层细胞大致在减数分裂二分体期开始发生染色体片段化,即细胞程序性凋亡(programmed cell death, PCD)的起始特征,随后在小孢子单核期发生绒毡层细胞降解^[23]。分析发现,相对于正常可育水稻材料,野败不育系的花药绒毡层发生PCD的时期提前到减数分裂 I 前期。以WA352为诱饵,通过酵母双杂交筛选到核基因表达的线粒体细胞色素c氧化酶亚基COX11,证明COX11是不育蛋白WA352的互作因子。进一步证明COX11除了参与呼吸链的能量代谢之外(作为细胞色素c氧化酶复合体的组装因子),还具有清除活性氧的功能,但WA352对能量代谢的影响不是CMS-WA发生的关键因素。当在花粉母细胞期的绒毡层特异积累的WA352蛋白与COX11互作后,COX11清除活性氧的功能受到抑制,导致绒毡层活性氧爆发和细胞色素c从线粒体释放到细胞浆。这些信号提早诱导绒毡层发生PCD和细胞快速降解,导致花粉发育异常而败育(图2)。这些发现阐明了CMS-WA不育发生的分子机理,并揭示出COX11作为PCD调控因子的新功能^[23]。

3.2 野败型相关不育基因的起源进化研究

对线粒体序列分析表明,WA352位于线粒体基因*rpl5*下游,由多个功能未知的线粒体基因片段重组而成。Tang等人^[24]通过对800多个野生稻和栽培稻基因组中WA352相关区段的序列分析,共找到了10种与WA352相关的重组结构。通过比较这些重组结构的序列相似性,追索重构了它们的复杂的起源进化路

径。通过转基因功能分析和以栽培稻保持系进行回交转育验证,发现了3个新的CMS基因,即WA352a, WA352b和WA314;而WA352(重新命名为WA352c)直接来源于WA352b,即WA352c是最年轻的CMS新基因。研究还首次发现了2个古老型的CMS原基因(proto gene),它们的表达蛋白不能与COX11互作而没有CMS功能。这些原基因经过序列变异和重组,其编码蛋白获得与COX11互作的能力而成为多个CMS功能基因WA352a, WA352b, WA352c和WA314。这些结果表明CMS新基因的起源进化经历了从原基因通过功能化并伴随从低拷贝到高拷贝的变化过程(substoichiometric shifting),最终演化为功能基因^[24]。这些原基因和功能CMS基因的起源进化发生在普通野生稻部分居群,并遗传到部分籼稻材料,其中WA352c在普通野生稻和低纬度地区的籼稻材料中以约1%的频率存在。这个事实说明,在海南发现的野败型野生稻和其他育种家用于育成上述多种孢子体型不育系的野生稻和栽培稻材料含有相同起源的CMS基因WA352c,即它们具有共同不育细胞质的遗传基础。

3.3 野败型雄性不育恢复性的遗传分析、基因克隆和机理研究

遗传学分析表明,野败型育性恢复主要受2对恢复基因*Rf3*和*Rf4*控制,分别被初步定位在第1和第10号染色体^[25]。Yao等人^[26]把*Rf3*和*Rf4*分别定位在第1号染色体距离RG532标记6 cM和第10号染色体距离G4003标记3.3 cM的位置;而张群宇等人^[27]利用近等基因系分离群体将*Rf4*定位在第10号染色体离Y3-8标记0.9 cM的位置。多年来国内外多个实验室试图克隆*Rf3*和*Rf4*,但研究长期徘徊不前。Wang等人^[28]和Hu等人^[29]经过多年的研究,把*Rf4*精细定位在第10号染色体的137 kb的区间。该定位区段位于之前克隆的CMS-BT和CMS-HL恢复基因*Rf1a* (*Rf5*)的旁邻,属于1个共有10~11个PPR (pentatricopeptide repeat)基因的基因簇。经过遗传转化最终确定编码782个氨基酸的*PPR9-782-M*具有恢复CMS-WA育性的功能,即是*Rf4*基因^[30]。*PPR9-782-M*编码蛋白与*Rf1a*编码的*PPR3-791-M*都是含有18个PPR基序,氨基酸序列一致性达86%,但它们只能分别特异地对野败型和包台/红莲型不育恢复育性。序列分析发现功能型(显性)*Rf4*具有多种复等位基因变异,而非功能型(隐性)突变可分

为粳型 $rf4-j$ (大量碱基变异)和籼型 $rf4-i$ (含2个片段插入产生提前终止密码子)。研究表明, RF4在转录后水平降解不育基因WA352c转录本而恢复育性, 而RF3不影响WA352c转录本, 但抑制WA352c蛋白的产生积累而实现育性恢复的生物学功能(图2)^[23,30]。

3.4 核质互作不育性与恢复性的分子基础

经典遗传学把隐性核恢复基因与细胞质不育基因的遗传互作导致的雄性不育定义为核质互作不育。而近年来克隆的恢复基因表明, 显性核恢复基因通过抑制CMS基因表达而恢复育性。其中, 位于第10号染色体的CMS-BT型恢复基因 $Rf1a$ 和 $Rf1b$ 的编码产物PPR3-791和PPR2-506进入线粒体, 分别特异性切割和降解不育基因的转录本 $B-atp6/ORF79$ ^[28]; CMS-HL的恢复基因 $Rf5$ 其实就是CMS-BT恢复基因 $Rf1a$, 其编码蛋白与另一个核基因编码的蛋白GRP形成复合体, 切割CMS-HL不育基因ORFH79的转录本而实现育性恢复^[29]。CMS-WA的恢复基因 $Rf4$ 编码的PPR9-782-M蛋白进入线粒体, 以未知的机制降解WA352的转录本而恢复育性^[30]。另一方面, WA352c蛋白与核编码的线粒体蛋白COX11的互作是雄性不育发生的分子基础^[23], 而WA352c蛋白在花粉母细胞期的绒毡层特异积累可能也是由核基因控制的。因

此, 植物细胞质雄性不育及其恢复性涉及不同层次的核质基因互作^[6]。

4 “三系”杂交稻育种的问题和展望

4.1 “三系”恢保关系的局限性

遗传背景单一的农作物在生产上大面积推广, 对生物或非生物胁迫的抵抗性变得脆弱, 存在作物大面积感病、受灾的风险, 从而影响粮食安全。20世纪50年代, 美国杂交玉米就是因为大面积的CMS-T型细胞质不育系材料, 最终由于杂交玉米小斑病大爆发而导致杂交玉米行业毁于一旦。研究表明, 引起玉米CMS-T型细胞质不育的 $T-urf13$ 基因, 同时也是造成玉米对叶斑病原菌敏感的关键基因, 因此所有杂交玉米都对小斑病病原菌易感^[31]。目前, 我国杂交稻的遗传单一化的趋势越来越明显。三系杂交籼稻的大部分不育系含有CMS-WA细胞质(含相同的WA352c基因)的亲缘关系。20世纪80年代初, 以籼型杂交稻“汕优63”组合为例, 谢华安^[32]育成的恢复系“明恢63”并与不育系“珍汕97A”配组培育出“汕优63”, 在5年时间内就成为全国杂交水稻播种面积最多的品种, 年平均种植面积连续十几年稳定在460万公顷左右, 约占全国籼稻区总面积的22%, 创下了杂交水稻推广速度最快、年种植面积最广、累计种植面积最大、增产稻谷总量最高4个全国之最。另一方面, 对于如此大面积的单一品种种植, 一旦引起大规模病害爆发, 必将严重威胁我国的粮食安全。

因此, 当前亟需扩大我国不育系类型和恢复系的遗传多样性。粳型杂交稻由于缺乏优良的恢复系, 恢复谱狭窄, 遗传差异小, 杂种优势不明显。此外, BT型或HL型粳稻不育系均为配子体不育类型, 其花粉败育程度不完全, 且易受高温复育影响, 杂交种子纯度难以保证, 制种风险高。因此, 改良野败型及类似的孢子体型粳稻不育系, 将有利于粳型杂交稻的进一步发展^[16]。

4.2 不育系“包颈”现象及其克服

在杂交稻生产中, 不管是三系的细胞质雄性不育还是两系的核不育系都存在一个共同的问题, 就是在生育后期出现稻穗不完全抽出的“包颈”现象(穗下部的颖花被剑叶叶鞘包裹), 造成部分颖花不能正常授粉^[33], 从而影响制种和繁种产量。“包颈”现象可

图2 (网络版彩色)野败型细胞质雄性不育与恢复性的分子机理。WA352 基因起源于普通野生稻线粒体基因组的复杂重组事件。WA352 蛋白在花粉母细胞期的绒毡层积累并与COX11 互作, 诱发活性氧(ROS)爆发和细胞色素c释放到细胞浆, 导致花药绒毡层细胞提前凋亡和花粉败育。RF4 和RF3 从mRNA水平或蛋白水平, 以不同的机制抑制不育基因WA352 表达而恢复育性

Figure 2 (Color online) The molecular mechanism of CMS-WA and fertility restoration

能与其花粉败育密切相关,花粉败育引起倒一节间中穗源生长素的亏缺,降低最上节间中活性赤霉素含量导致其伸长受阻并引起“包颈”^[34]。在生产上,通常是利用植物赤霉素(商品制剂“九二〇”)的化学法解除不育系“包颈”问题,但这无疑增加了制种的生产成本,影响种子质量。

水稻最上节间伸长(elongated uppermost internode, *eui*)性状是由隐性基因控制的。目前,已确定的主效基因有 *eui1* 和 *eui2*^[35]。已克隆的 *eui1* 编码一个 P450 蛋白,它可以将水稻体内的活性赤霉素 GA 失活,该酶突变后,导致活性 GA 过度积累在水稻最上节间而引起的长颈穗表型(图 3)^[36]。*eui1* 自发现以来就受到学者的关注, Rutger 和 Carnahan^[37] 将其称为杂交水稻生产中除不育系、保持系、恢复系之外的“第四遗传要素”。利用该性状可以提高杂交水稻的制种产量,促进杂交水稻的发展。申宗坦等人^[33] 通过杂交及回交转育方法,把 *eui1* 导入 CMS-WA 不育系 ZS97A,消除了不育系的“包颈”现象。鉴于 *eui* 种质在遗传育种中,具有较高的诱变频率,福建农林大学杨仁崔等人^[38,39] 提出直接诱变现有的三系和两系生产体系中的不育系和恢复系,培育长颈穗的不育系和隐性高秆恢复系,进而育成 e 杂交稻的技术路线,并率先育成了 e-超级稻。从已有的生产实践看,带有 *eui* 基因的不育系 eA, eS 株高均明显增加,“包颈”现象显著解除或缓解,异交特性得到明显改善^[35]。因此,在杂交稻育种中引入 *eui1* 种质创造株型理想的不育系和恢复系,将降低生产成本,提高杂交制种产量。

4.3 利用生物技术创建新型不育系和杂交制种新技术

近年来,植物基因功能组学研究突飞猛进,现代生物技术革命日新月异,以植物基因工程和分子育种技术为代表的高新育种技术正在成为国际作物育种的发展趋势。分子育种技术和传统育种技术的交融,正在从深度与广度上推进作物育种科学的发展。为了突破不育系单一化局面,扩大恢复系谱范围,更加自由地进行杂交配组,利用生物技术创造人工雄性不育系,主要有以下几种策略:

策略一:利用花药或花粉绒毡层特异表达的启动子驱动细胞毒素基因表达产生不育系,驱动细胞毒素的抑制基因表达产生恢复系^[40]。

策略二:借助于诱导型启动子通过特定的诱导

图 3 (网络版彩色) *eui* 材料、保持系和不育系的抽穗情况。剑叶基部(虚线所示)与穗颈节(白色箭头所指)之间的距离为穗颈长,是衡量穗抽出度的重要指标。正常的可育水稻品种如保持系(珍汕 97B, ZS97B)穗颈长约 2~3 cm,但 *eui1* 的穗颈长度则可达 25~30 cm;相反,不育系(珍汕 97A, ZS97A)的穗颈节却被剑叶叶鞘所包裹,导致穗子无法完全抽出,形成“包颈”现象

Figure 3 (Color online) Panicle shooting status in *eui1* line, maintainer line (ZS97B) and CMS line (ZS97A)

表达细胞毒素基因产生不育系。

策略三:借助于诱导型启动子驱动核不育基因形成人工育性可控系。在特定条件下诱导表达核不育基因形成不育系,与可育材料杂交制种:在非诱导条件下,人工育性可控系可自繁保种,达到一系两用和自由配组的目的。

策略四:参考在玉米创建的不育系和杂交种生产方法,筛选孢子体不育突变体,克隆相关的野生型育性基因。将此育性基因与花粉杀配子基因和荧光蛋白基因一起转化不育突变体,获得转基因半合体。其自交可产生 50% 的纯合不育基因型种子和 50% 的转基因半合体。利用荧光分选将这 2 类种子分开,纯合不育基因型种子可用于杂交制种^[41]。

策略五：利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术^[42]将现有优良三系保持系和其他优良品种中的光温敏不育相关的野生型基因(如 *TMS5*, *CSA*)定点敲除, 育成新的光温敏不育系^[43,44]。

1987 年, 袁隆平提出对杂交水稻育种的设想, 分为三个发展阶段: 三系法品种间杂种优势利用; 二系法亚种间杂种优势利用; 一系法远缘杂种优势利用。从当前的杂交稻现状来看, 一系法缺乏切实可行

的遗传材料, 与农业生产实践还有很长的距离; 两系法取得长足进步, 成效显著, 但容易受温度制约, 育性波动较大, 制种风险较高, 种子纯度难以保证。因此, 当前杂交稻育种工作的重点是“三系”与“两系”并举, 在研究和利用高产、优质、抗逆等农艺性状基因的基础上, 开展籼粳稻杂种不育与亲和性的分子遗传机理研究, 积极利用水稻亚种间杂种优势, 并研发新型的不育系和杂交制种技术体系。

参考文献

- Cheng S, Zhuang J, Fan Y, et al. Progress in research and development on hybrid rice: A super-domesticated in China. *Ann Bot*, 2007, 100: 959–966
- Tester M, Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 2010, 327: 818–822
- Lin S C, Yuan L P. *Innovative Approaches to Rice Improvement*. Manila, Philippines: IRRI, 1980. 35–51
- Vedel F, Pla M, Vitart V, et al. Molecular basis of nuclear and cytoplasmic male sterility in higher plants. *Plant Physiol Bioch*, 1994, 32: 601–608
- Guo J, Liu Y G. The genetic and molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice. *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 2404–2409
- Chen L, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 579–606
- Yuan L P. A preliminary report on male sterility in rice, *Oryza sativa* L. *Chin Sci Bull*, 1966, 11: 322 [袁隆平. 水稻的雄性不孕性. *科学通报*, 1966, 17: 185–188]
- Li C. The progresses on three-line and two-line hybrid rice breeding (in Chinese). *Crops*, 1998, (3): 3–6 [李成荃. 三系和两系杂交水稻育种进展. *作物杂志*, 1998, (3): 3–6]
- Katsuo K, Mizushima U. Studies on the cytoplasmic difference among rice varieties. *Oryza sativa* L.: I. On the fertility of hybrids obtained reciprocally between cultivated and wild varieties. *Jpn J Breed*, 1958, 8: 1–5
- Shinjo C. Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice, *Oryza Sativa* L. *Jpn J Genet*, 1969, 3: 149–156
- Li Z. Hybrid rice and the morphological breeding of CMS-Dian (in Chinese). *Yunnan Sci Technol News*, 2003, 2 [李铮友. 杂交水稻与“滇型”株型育种. *云南科技报*, 2003, 第 2 版]
- Yao Z, Gu W, Li M, et al. The history, satus and perspect of hybrid *japonica* rice in China (in Chinese). *Mod Agric Sci Technol*, 2006, (11): 116–117 [姚志刚, 顾伟, 黎明, 等. 我国杂交粳稻研究的历史、现状及其对策. *现代农业科技*, 2006, (11): 116–117]
- The Rice Heterosis Group of Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences. *Japonica* hybrid rice Jingyin66 CMS line × No.300 (in Chinese). *Agric Sci Technol Bull*, 1980, (7): 2 [中国农业科学院作物所水稻杂优课题组. 杂交粳稻京引 66 不育系×300 号. *农业科技通讯*, 1980, (7): 2]
- Yang Z. The progresses on the breeding of *japonica* hybrid rice (in Chinese). *Hybrid Rice*, 1994, 9(Z1): 46–49 [杨振玉. 粳型杂交水稻育种的进展. *杂交水稻*, 1994, 9(Z1): 46–49]
- Qi Z. A preliminary report on breeding of a wild abortive type *japonica* CMS line and indica restorer line in three-line system (in Chinese). *Jiangsu J Agric Sci*, 1982, (2): 15–17 [祁正汉. 水稻野败型粳不育系和粳恢复系三系选育初步小结. *江苏农业科学*, 1982, (2): 15–17]
- Yang J, Zhu X. The progresses on research and breeding of wild abortive type *japonica* hybrid rice (in Chinese). *China Rice*, 2009, (6): 1–3 [杨军, 朱旭东. 野败型杂交粳稻的研究及育种进展. *中国稻米*, 2009, (6): 1–3]
- Forde B G, Oliver R J, Leaver C J. Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasms in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 3841–3845
- Bonhomme S, Budar F, Féral M, et al. A 2.5-kb *Nco* I fragment of ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in brassica cybrids. *Curr Genet*, 1991, 19: 121–127
- Bonhomme S, Budar F, Lancelin D, et al. Sequence and transcript analysis of the *Nco*2.5 ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in brassica cybrids. *Mol Gener Genet*, 1992, 235: 340–348
- Mignouna H, Virmani S S, Briquet M. Mitochondrial DNA modifications associated with cytoplasmic male sterility in rice. *Theor Appl Genet*, 1987, 74: 666–669

- 21 Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, et al. The complete sequence of the rice (*Oryza Sativa* L.) mitochondrial genome: frequent dna sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268: 434–445
- 22 Liu Z, Xu H, Guo J, et al. Structural and expressional variations of the mitochondrial genome conferring the wild abortive type of cytoplasmic male sterility in rice. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49: 908–914
- 23 Luo D, Xu H, Liu Z, et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nat Genet*, 2013, 45: 573–577
- 24 Tang H, Zheng X, Li C, et al. Multi-step formation, evolution, and functionalization of new cytoplasmic male sterility genes in the plant mitochondrial genomes. *Cell Res*, 2016, doi: 10.1038/cr.2016.115
- 25 Zhang G, Lu Y, Bharaj T S, et al. Mapping of the *Rf-3* nuclear fertility-restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 27–33
- 26 Yao F Y, Xu C G, Yu S B, et al. Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild-abortion cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza Sativa* L.). *Euphytica*, 1997, 98: 183–187
- 27 Zhang Q, Liu Y, Zhang G, et al. Molecular mapping of the fertility restorer gene *Rf-4* for WA cytoplasmic male sterility in rice (in Chinese). *Acta Genet Sin*, 2002, 29: 1001–1004 [张群宇, 刘耀光, 张桂权, 等. 野败型水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf-4* 的分子标记定位. *遗传学报*, 2002, 29: 1001–1004]
- 28 Wang Z, Zou Y, Li X, et al. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II 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
- 29 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
- 30 Tang H, Luo D, Zhou D, et al. The rice restorer *Rf4* for wild-abortion cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial-localized PPR protein that functions in reduction of WA352 transcripts. *Mol Plant*, 2014, 7: 1497–1500
- 31 Levings C S. Thoughts on cytoplasmic male sterility in CMS-T maize. *Plant Cell*, 1993, 5: 1285
- 32 Xie H, Zheng J, Zhang S, et al. The research and application of the “Shanyou 63” elite hybrid rice with the largest cultivated area in China (in Chinese). *Fujian J Agric Sci*, 1996, (4): 1–6 [谢华安, 郑家团, 张受刚, 等. 中国种植面积最大的水稻良种“汕优 63”培育的理论与实践. *福建省农业科学院学报*, 1996, (4): 1–6]
- 33 Shen T, Yang C, He Z. Studies on eliminating panicle enclosure in WA Type MS line of rice (*Oryza sativa* subsp. *indica*) (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 1987, 1: 95–99 [申宗坦, 杨长登, 何祖华. 消除籼型野败不育系包颈现象的研究. *中国水稻科学*, 1987, 1: 95–99]
- 34 Yin C, Gan L, Ng D, et al. Decreased panicle-derived indole-3-acetic acid reduces gibberellin A1 level in the uppermost internode, causing panicle enclosure in male sterile rice Zhenshan 97A. *J Exp Bot*, 2007, 58: 2441–2449
- 35 Yang R, Zhang S, Huang R, et al. Research and development of *eui*-hybrids of rice. *Hybrid Rice* (in Chinese), 2005, 20: 14–17 [杨仁崔, 张书标, 黄荣华, 等. e-杂交稻的研究与发展. *杂交水稻*, 2005, 20: 14–17]
- 36 Zhu Y, Nomura T, Xu Y, et al. Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell*, 2006, 18: 442–456
- 37 Rutger J N, Carnahan H L. A fourth genetic element to facilitate hybrid cereal production—a recessive tall in rice. *Crop Sci*, 1981, 21: 373–376
- 38 Yang R. The genetic assessment and breeding application of *eui* germplasm in rice (in Chinese). *Engin Sci*, 2005, 7: 26–30 [杨仁崔. 水稻 *eui* 种质的遗传评价和育种利用. *中国工程科学*, 2005, 7: 26–30]
- 39 Yang R, Zhang S, Huang R, et al. Breeding technology of *eui*-hybrids of rice (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2002, 35: 233–237 [杨仁崔, 张书标, 黄荣华, 等. 高秆隐性杂交稻(e-杂交稻)的育种技术. *中国农业科学*, 2002, 35: 233–237]
- 40 Burgess D G, Ralston E J, Hanson W G, et al. A novel, two-component system for cell lethality and its use in engineering nuclear male-sterility in plants. *Plant J*, 2002, 31: 113–125
- 41 Perez-Prat E, van Lookeren Campagne M M. Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 199–203
- 42 Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8: 1274–1284
- 43 Zhou H, He M, Li J, et al. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using CRISPR/Cas9 mediated *TMS5* editing system. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep37395
- 44 Li Q, Zhang D, Chen M, et al. Development of *japonica* photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing *Carbon Starved Anther* using CRISPR/Cas9. *J Genet Genomics*, 2016, 43: 415–419

Discovery, utilization and molecular mechanisms of CMS-WA in rice

CHEN LeTian^{1,2} & LIU YaoGuang¹

¹ State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

² Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

The discovery and exploitation of the Wild Abortive type cytoplasmic male sterility (CMS-WA) is a key issue in hybrid rice breeding for utilization of heterosis, which is the best successful case for exploitation of wild plant resources in agriculture. In this review, we traced the history of discovery and research of CMS-WA, and introduced the latest progresses on study of the molecular basis of CMS-WA and its restoration as well as the evolution of the related genes. The Chinese scientist Yuan LongPing pioneered the study of male sterility in rice since 1964. In 1970s, Yuan's group discovered a male sterile wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) plant in Hainan Island of China, and designated this material as "Wild Abortive (WA)". Genetic study showed that this male sterility is conferred by the cytoplasm, thus is called CMS-WA. Chinese breeders made great efforts to breed CMS lines by introgression of the CMS-WA cytoplasm into a number of rice cultivars *via* backcrossing. Accordingly, related maintainer lines and restorer lines were bred to successfully develop the "three-line" system for hybrid rice production. The commercial hybrid rice was released in 1976 in China, and has occupied about 50% of the total rice planting area since the late 1980s, which increased grain yield by 20%–30%.

In recent years, scientists have made great progress on the molecular studies of CMS-WA and its restoration, and the evolution of the genes for this system. As representative in this field, LIU YaoGuang's group isolated the CMS-WA gene WA352 from the mitochondrial genome, which is a new gene consisting of multiple mitochondrial genomic segments of unknown function. WA352 is expressed constitutively into three transcripts, but the WA352 protein accumulates specifically in the anther tapetal cells at the microspore mother cell stage, and interacts directly with a nucleus-encoded protein COX11, which is the assembly factor for cytochrome *c* oxidase and also has a role in scavenge of reactive oxygen species (ROS) and inhibition of programmed cell death (PCD). When WA352 arrests COX11 by the interaction, the metabolism of ROS is affected, leading to ROS burst and cytochrome *c* release to the cytosol and triggering premature PCD in the tapetum. This abnormal tapetal degeneration eventually causes pollen abortion.

Two loci, *Rf3* and *Rf4*, were mapped on chromosome 1 and 10, respectively, as the restorer genes for CMS-WA. *Rf4* was firstly cloned recently by Liu's group. *Rf4* encodes a pentatricopeptide repeat (PPR) protein (PPR9-782-M) possessing a mitochondrial transit signal and 18 PPR motifs, with high similarity to PPR3-791-M encoded by *Rf1a* of the CMS-BT system. The *Rf4* protein decreases the mRNA level of WA352, thereby restoring WA352-mediated male sterility probably in a post-transcriptional mechanism. However, *Rf3* does not affect the WA352 transcript abundance but impairs the production of WA352 protein. Thus, the studies indicate that plant CMS/restoration systems comprises multiple layers of cytoplasmic-nuclear gene interactions in the molecular level.

Recently, LIU's group further studied the evolutionary trajectory of WA352 by identification and characterization of a number of mitochondrial genomic recombinant structures related to WA352 in the wild rice. These structures originated and evolved through complex evolutionary routes by multiple rearrangements in the mitochondrial genome of *O. rufipogon*. The study revealed that functional CMS genes originated from non-CMS protogenes by sequence variation-based functionalization as well as substoichiometric shifting (i.e., copy number variation).

Finally, this review discussed the key issues and future directions of the hybrid rice breeding programs.

hybrid rice, heterosis, cytoplasmic male sterility, Wild Abortive

doi: 10.1360/N972016-01044