

## 分子标记辅助选择改良 C418 对红莲型粳稻不育系的恢复力

张宏根 仲崇元 司华 刘巧泉 顾铭洪 汤述翥\*

(扬州大学 江苏省作物遗传生理国家重点实验室培育点/粮食作物现代产业技术协同创新中心/教育部植物功能基因组学重点实验室, 江苏 扬州 225009; \*通讯联系人, E-mail: sztang@yzu.edu.cn)

### Improving the Ability of C418 to Restore the Fertility of the Honglian-type Cytoplasmic Male Sterility *japonica* Lines via Molecular Marker-assisted Selection

ZHANG Honggen, ZHONG Chongyuan, SI Hua, LIU Qiaoquan, GU Minghong, TANG Shuzhu\*

(Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology / Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops / Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; \*Corresponding author, E-mail: sztang@yzu.edu.cn)

**Abstract:** 【Objective】Efficient breeding of *japonica* restorers for Honglian(HL) type *japonica* cytoplasmic male sterile(CMS) lines is vital to develop HL-type *japonica* hybrids, which is of great significance for the development of three-line *japonica* hybrids. 【Method】*Rf6*, a fertility restorer gene for HL-type CMS, was identified from ‘9311’, an *indica* restorer for HL-type CMS lines. In our previous study, R1093, a chromosome segment substitution line derived from the cross between the donor parent ‘9311’ and the recipient parent ‘Nipponbare’, had been identified to carry *Rf6*. In the present study, *Rf6* was pyramided into C418, a BT-type *japonica* restorer only carrying *Rf1*, using backcross via marker-assisted selection, and the restoration ability of the improved lines for BT-, HL-type CMS lines was analyzed by testcrossing. 【Result】To 2016, a total of 67 improved lines, including 12 BC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> lines and 55 BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> lines, had been obtained, and most of the agronomic traits were well maintained in six improved lines. The testcrossed F<sub>1</sub> plants from improved lines and BT-Liuqianxin A exhibited the similar fertility levels with those of the testcrossed F<sub>1</sub> plants from C418. The significant increased fertility levels were observed on the testcrossed F<sub>1</sub> plants from improved lines and HL-Liuqianxin A, and most of these testcrossing lines exhibited fertility levels over 85%, indicating these improved lines can be applied to rice production. 【Conclusions】The pyramiding of *Rf6* and *Rf1* can improve the restoration ability of BT-type *japonica* restorer lines to HL-type *japonica* CMS lines, which should be an important way to breed HL-type *japonica* restorer lines.

**Key words:** *japonica*; Honglian-type; restorer line; marker-assisted selection

**摘 要:** 【目的】高效选育红莲型(Honglian, HL)粳稻恢复系有助于 HL 型杂交粳稻育种, 对促进三系杂交粳稻的发展具有重要的意义。【方法】*Rf6* 是一个 HL 型恢复基因, 来源于 HL 型籼稻强恢复系 9311。前期研究中, 在以 9311 为供体、日本晴为受体的一套染色体片段代换系中鉴定出携带 *Rf6* 的株系 R1093。本研究利用 R1093 与 BT 型粳稻恢复系 C418(携带 *Rf1*)杂交, 通过常规回交育种结合分子标记辅助选择技术, 将 *Rf6* 导入 C418 中, 进行 *Rf6* 与 *Rf1* 聚合育种; 利用 BT 型、HL 型六千辛 A 进行测交鉴定改良系的恢复力。【结果】共获得 12 个 BC<sub>3</sub>F<sub>4</sub> 株系和 55 个 BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> 株系, 其中 6 个改良系的农艺性状已基本接近 C418; 测交鉴定结果表明聚合 *Rf6* 的改良系对 HL 型粳稻不育系的恢复度达到 85%以上, 可应用于水稻生产; 对 BT 型粳稻不育系的恢复度提升效果不显著。【结论】聚合 *Rf6* 能有效改良 BT 型粳稻恢复系对 HL 型粳稻不育系恢复力, 是选育 HL 型粳稻恢复系的一条重要途径。

**关键词:** 粳稻; 红莲型; 恢复系; 分子标记辅助选择

中图分类号: Q755; S511.0351

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)05-0445-08

收稿日期: 2017-12-24; 修改稿收到日期: 2018-03-01。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2016YFD0101107); 国家自然科学基金资助项目(31771743); 江苏高校优势学科建设工程项目。

水稻是我国第一大粮食作物,促进水稻产量的增长有助于保障我国粮食安全。当前,我国水稻种植面积约0.3亿 $\text{hm}^2$ ,其中籼稻约占2/3,杂交籼稻约占籼稻种植面积的80%,而杂交粳稻只占粳稻种植面积的3%左右<sup>[1]</sup>。育种实践证明,杂交稻较常规稻有15%~20%的增产潜力<sup>[2]</sup>。因此,发展杂交粳稻是我国水稻增产的一条有效途径。

杂交稻分为三系法杂交稻与两系法杂交稻。三系法杂交稻利用的是质核互作雄性不育系,包台(Chinsurah Boro II, BT)型、红莲(Honglian, HL)型、野败(Wild Abortive, WA)型水稻不育胞质的恢保关系不同,花粉败育时期及特征不同,育性遗传方式不同,被认为是3种代表类型<sup>[3]</sup>。三系杂交粳稻以利用BT型不育系为主。BT型不育系花粉三核期败育,败育时期相对较晚,花粉呈染败类型,BT型粳稻不育系不育性欠稳定,影响制种纯度<sup>[4]</sup>。为克服BT型粳稻不育系不育性欠稳定及细胞质单一的问题,育种家在杂交粳稻育种过程中探索利用其他不育细胞质。鉴于WA型不育系不育性稳定,在20世纪70年代育种家们便开展了WA型粳三系育种工作,但转育成的WA型粳稻不育系存在两大问题:一是开花习性差,二是难以筛选到强恢复源,致使WA型粳稻不育系难以利用。HL型不育系花粉为圆败类型,与BT型不育系染败花粉相比,花粉败育相对彻底。本课题组通过多年研究发现,HL型粳稻不育系的开花习性而异交结实性与BT型粳稻不育系无显著差异,而不育性较BT型不育系稳定,可恢复性虽不如BT型不育系,但远优于WA型不育系<sup>[5-8]</sup>,可以选育HL型粳稻不育系及相应恢复系来配制杂交粳稻新组合。HL型不育系与BT型不育系均属于配子体不育类型,具有类似的恢保关系<sup>[8]</sup>,因此HL型粳稻不育系可以由主栽粳稻品种直接转育,目前本课题组已培育出多个HL型粳稻不育系。对HL型粳稻恢复系筛选研究发现,现有大多数BT型粳稻恢复系对HL型不育系只具有部分恢复力,难以直接用于杂交稻配组<sup>[8]</sup>。因此,加强HL型粳稻恢复系的选育对于促进HL型三系杂交粳稻在生产上应用具有重要的意义。

有关BT型恢复基因的遗传与定位,大多数研究认为BT型恢复系带有1对恢复基因*Rf1*,并将该基因定位于第10染色体长臂上,在*Rf1*位点内存在两个育性恢复基因*Rf1a*和*Rf1b*,且*Rf1a*上位于*Rf1b*<sup>[9,10]</sup>。HL型恢复基因遗传研究主要集中在籼稻核背景下。多数研究认为HL型籼稻不育系的育性恢复受1对基因控制,绝大多数恢复系所带的恢复

基因为*Rf5*,该基因与BT型恢复基因*Rf1a*为同一基因;但HL型强恢复系9311除携带*Rf5*外,它还携带位于第8染色体上的一个恢复基因*Rf6*<sup>[11-15]</sup>。目前,尚未见有关*Rf6*用于杂交粳稻恢复系选育的报道。

C418是一个配合力较强的BT型粳稻恢复系,利用C418已选育了多个杂交粳稻组合,如屈优418、泗优418、9优418、3优18、陵香优18、陵风优18、双优18等。C418与大多数BT型粳稻恢复系一样,对HL型粳稻不育系仅具有部分恢复力。本课题组在前期研究中,从以9311为供体、日本晴为受体的一套染色体片段系中鉴定出1个携带HL型恢复基因*Rf6*的代换系R1093<sup>[16]</sup>。本研究通过常规回交育种结合分子标记辅助选择技术,将*Rf6*导入BT型粳稻恢复系C418中;在此基础上,分析导入*Rf6*的改良系对HL型粳稻不育系的恢复力,探索选育HL型粳稻恢复系的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

受体品种为BT型粳稻恢复系C418(携带恢复基因*Rf1*),由辽宁省农业科学院选育;供体品种为以9311为供体的日本晴背景代换系R1093(携带恢复基因*Rf6*)。测配亲本为BT型、HL型粳稻不育系六千辛A及BT型粳稻不育系52605A。上述代换系及不育系材料均由本课题组选育。

### 1.2 恢复基因聚合系的选育

试验于2012年至2016年分别在扬州大学实验农牧场和海南陵水扬州大学南繁基地进行。2012年冬季海南,种植各亲本,同时配制52605A/C418和C418/R1093这2个 $F_1$ 组合。

2013年正季扬州,种植所配 $F_1$ 组合,以C418为母本,配制C418//C418/R1093 $BC_1F_1$ 组合,收获52605A/C418 $F_1$ 植株上种子。

2013年冬季海南,种植 $BC_1F_1$ 群体,田间观察表型并结合分子标记检测结果选择带有*Rf6*的单株为父本与C418杂交,同时温室种植52605A/C418 $F_2$ 群体。

2014年正季扬州,种植 $BC_2F_1$ 群体,结合分子标记检测结果选取基因型为*Rf1Rf1Rf6rf6*的单株作父本进行回交,并筛选优良单株留种。

2014年冬季海南,种植 $BC_2F_2$ 、 $BC_3F_1$ 群体,在 $BC_3F_1$ 群体中继续选取目标单株回交;在 $BC_2F_2$ 群体中选取1株基因型为*Rf1Rf1rf6rf6*、6株基因型为

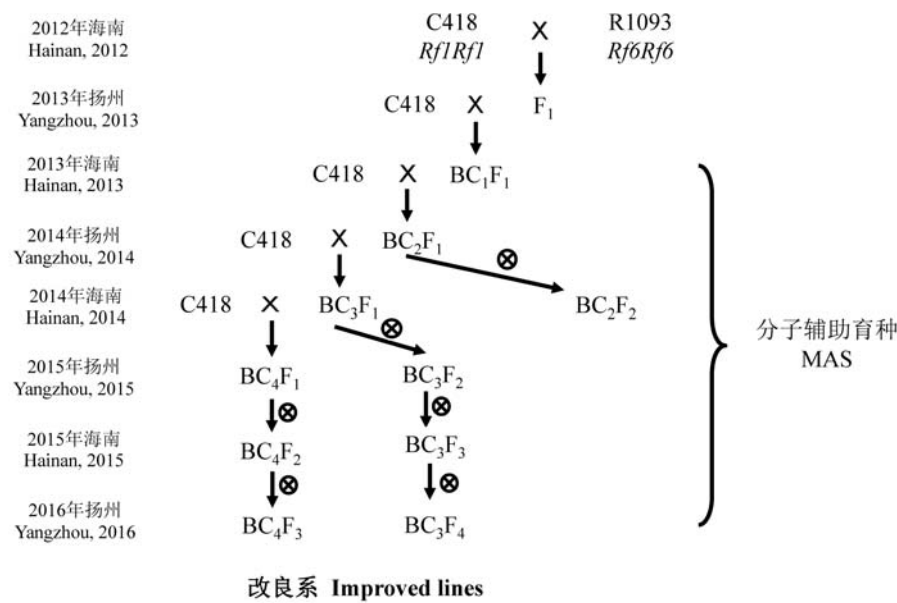


图1 恢复基因聚合系的选育过程

Fig. 1. Breeding scheme of the improved lines.

$Rf1Rf1Rf6Rf6$  的植株及 C418 分别与 HL 型六千辛 A 配制相应的测交  $F_1$ ；在  $BC_3F_1$  群体中，结合分子标记检测结果筛选优良单株留种。

2015 年正季扬州，种植  $BC_3F_2$ 、 $BC_4F_1$  和测交  $F_1$ ；在  $BC_3F_2$ 、 $BC_4F_1$  群体中，结合分子标记检测结果筛选优良单株留种。

2015 年冬季海南，种植  $BC_3F_3$ 、 $BC_4F_2$  株系。从这些株系中，随机选择 10 株  $Rf6$  纯合基因型植株及 C418 分别与 BT 型、HL 型六千辛 A 测交；筛选出 6 个  $Rf6$  位点纯合且农艺性状与 C418 相近的株系。C418 回交改良过程如图 1 所示。

以上试验材料正季在扬州于 5 月 10 日播种，6 月 10 日移栽，冬季在海南陵水 12 月 15 日播种，1 月 15 日移栽，每行栽插 10 株，单苗栽插，株行距  $13.3\text{ cm} \times 25.0\text{ cm}$ ，栽插密度为 30 万穴/ $\text{hm}^2$ ，水稻生长期间管理同一般大田。

### 1.3 水稻 DNA 的提取及 PCR 扩增

水稻基因组 DNA 提取采用 CTAB 法<sup>[17]</sup>，并稍作改进。检测  $Rf6$  的标记为 RM407<sup>[16]</sup>，检测  $Rf1$  的标记为 STS10-16<sup>[18]</sup>，引物序列列于表 1。PCR 扩增采用 20  $\mu\text{L}$  的反应体系：2.5  $\mu\text{L}$  模板 DNA、2  $\mu\text{L}$  10 $\times$

缓冲液(不含  $\text{Mg}^{2+}$ )、2  $\mu\text{L}$  dNTPs(2.5 mmol/L)、2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L)、1.6  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol/L}$  的引物、0.2  $\mu\text{L}$  的  $Taq$  酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )，11.7  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增程序：95 $^{\circ}\text{C}$  下预变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$  下变性 40 s，53 $^{\circ}\text{C}$  下退火 40 s，72 $^{\circ}\text{C}$  下延伸 40 s，扩增 30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$  下延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$  下保温。扩增产物在 3% 琼脂糖凝胶中电泳，经溴化乙锭染色后在 Bio-Rad 凝胶成像系统下拍照并分析电泳结果。

### 1.4 恢复基因聚合系的恢复力鉴定

2015–2016 年正季扬州，待种子成熟后，选取测交系小区中部 3~5 株(2015 年取样 5 株，2016 年取样 3 株)考查整株自然小穗育性。

### 1.5 农艺性状调查

每个株系种植 60 株，2 次重复。抽穗后记载各小区的始穗期，并折算成播始天数(播种至始穗的天数)。成熟后，每小区调查 10 株的穗数计算单株穗数；齐地面割取 10 个主茎，测定株高、剑叶、倒 2 叶、倒 3 叶叶片长度、剑叶出叶角度(剑叶基部与主茎的夹角)、茎粗、穗颈粗度(颈粗)、穗叶差(剑叶叶尖高度与穗尖高度的差值，剑叶叶尖高于穗尖为正值，剑叶叶尖低于穗尖为负值)、主茎穗长、主茎穗

表 1 恢复基因连锁标记及引物序列

Table 1. Primers anchoring  $Rf6$  and  $Rf1$ .

基因	标记	正向序列	反向序列
Gene	Marker	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
$Rf6$	RM407	GACTACGAGACGAGTGATTTGAACC	GCGTGGGAAATGACTAGGAGTAGG
$Rf1$	STS10-16	CAGCAATCGGATCGCCTC	ATCTTTCCGTGATGGGAGGTA

总粒数、一次枝梗数和穗弯曲度。

## 1.6 统计分析

数据利用 SPSS 21.0 软件进行处理, 农艺性状及测交  $F_1$  小穗育性按系与对照分别进行差异显著性测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 C418 所带恢复基因的验证

已有的研究表明, C418 携带 BT 型恢复基因  $Rf1(Rf1a/Rf1b)^{[9]}$ 。为验证 C418 是否仅携带  $Rf1$  基因, 2013 年冬, 在温室种植 52605A/C418  $F_2$  群体, 利用与  $Rf1$  紧密连锁的标记 STS10-16 对  $F_2$  群体内 94 株单株进行检测, 部分植株电泳结果如图 2。

BT 型不育系属配子体不育类型, 若 C418 仅带  $Rf1$ , 由于  $F_1$  植株携有  $rf1$  的配子不参与受精, 52605A/C418  $F_2$  群体中  $Rf1$  位点仅出现  $Rf1Rf1$  与  $Rf1rf1$  基因型, 表现为双亲杂合带型及 C418 带型, 且两种带型的植株比应为 1:1。从图 2 中可以发现, 标记 STS10-16 在  $F_2$  群体中仅扩增出双亲杂合带型及 C418 带型, 其中扩增出杂合带型的植株 51 株, 扩增出 C418 带型的植株 43 株, 两者符合 1:1 分离比( $\chi^2=0.681 < \chi^2_{0.05,1}=3.84$ ), 表明 C418 仅带有 1 对

主效恢复基因, 即  $Rf1$ 。

### 2.2 连锁标记的筛选及分子标记辅助选择结果

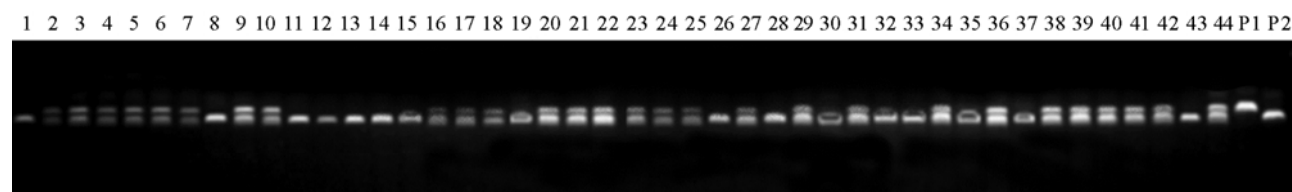
$Rf6$  为 HL 型胞质雄性不育恢复基因, 本实验室在粳稻核背景下对其精细定位过程中, 共开发了 61 对 SSR 和 InDel 标记<sup>[16]</sup>, 用这些标记对 C418 和 R1093 进行多态性分析, 获得了 14 对在双亲间具有多态且具有较好扩增效果的标记, 其中标记 RM407 与  $Rf6$  相距大约 15 kb, 与  $Rf6$  发生交换的概率非常低, 从减少分子检测工作量的角度考虑, 本研究仅选择 RM407 用于  $Rf6$  位点的检测; 同时, 我们选用标记 STS10-16 对  $Rf1$  位点进行检测。标记 RM407 及 STS10-16 对  $BC_2F_2$  群体内单株检测结果如图 3 所示。

2013—2016 年间, 利用标记 RM407 对不同回交世代群体内的单株进行检测, 不同基因型植株检测结果见表 2。

由表 2 可以看出, 在标记 RM407 处, 不同基因型的单株在各回交世代群体中分离比均接近理论值, 说明利用该标记对  $Rf6$  位点选择是可行的。至 2016 年正季, 共获得了 12 个  $BC_3F_4$ 、55 个  $BC_4F_3$  株系(基因型为  $Rf1Rf1Rf6Rf6$ )。

### 2.3 改良系对 HL 型粳稻不育系的恢复力鉴定

2014 年冬季海南, 在  $BC_2F_2$  群体中, 根据标记

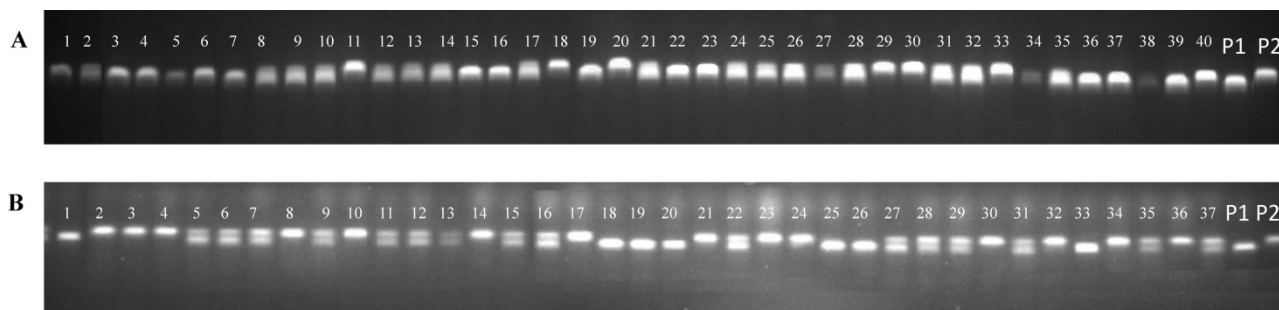


P1 为 52605A; P2 为 C418; 1~44 为 52605A/C418  $F_2$  群体内单株。

P1 and P2 are 52605A and C418, respectively, and others are individuals from 52605A/C418  $F_2$  population.

图 2 标记 STS10-16 对 52605A/C418  $F_2$  群体部分单株琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 2. Molecular detection of 52605A/C418  $F_2$  individuals using STS10-16.



A—标记 RM407 扩增结果; B—标记 STS10-16 扩增结果。P1 为 C418; P2 为 R1093; 1~40 为 C418//C418/R1093  $BC_2F_2$  群体内单株。

A, PCR amplification products using primer RM407; B, PCR amplification products using primer STS10-16. P1 and P2 are C418 and R1093, respectively, and others are individuals from C418//C418/R1093  $BC_2F_2$  population.

图 3 标记对 C418//C418/R1093  $BC_2F_2$  群体部分单株琼脂糖凝胶电泳检测结果

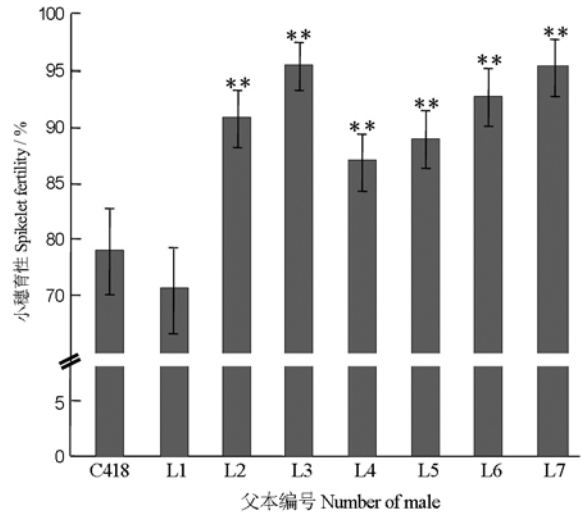
Fig. 3. Molecular detection of C418//C418/R1093  $BC_2F_2$  individuals.

表 2 各世代的分子标记辅助选择结果

Table 2. Distribution of individuals of different genotypes at *Rf6* locus in  $BC_nF_1$  and  $BC_nF_2$  populations.

世代 Generation	植株数 Number of measured plants	基因型 Genotype			频率 Frequency/ %
		<i>Rf6Rf6</i>	<i>Rf6rf6</i>	<i>rf6rf6</i>	
$BC_1F_1$	160	0	75	85	46.9
$BC_2F_1$	100	0	47	53	47.0
$BC_2F_2$	120	29	54	37	24.2
$BC_3F_1$	19	0	9	10	47.3
$BC_4F_1$	298	0	124	174	41.6
$BC_4F_2$	1000	243	461	296	24.3

恢复基因频率指的是  $BC_nF_1$  群体中基因型为 *Rf6rf6* 植株比例,  $BC_nF_2$  群体中基因型为 *Rf6Rf6* 植株比例。  
Individuals with the genotypes of *Rf6rf6* and *Rf6Rf6* in  $BC_nF_1$  and  $BC_nF_2$  populations, respectively, are selected to analyze the frequency of *Rf6*.



\*\*表示与 C418 测交  $F_1$  的小穗育性存在极显著差异。C418 和 L1 基因型为 *Rf1Rf1rf6rf6*, L2~L7 基因型为 *Rf1Rf1Rf6Rf6*。  
All values are listed as mean $\pm$ SD; \*\* mean significantly different on spikelet fertility between  $F_1$ s from the improved lines and C418 at 0.01 level. The genotypes of C418 and L1 are *Rf1Rf1rf6rf6*, and the genotypes of L2~L7 are *Rf1Rf1Rf6Rf6*.

图 4 HL 型六千辛 A 与改良系及对照 C418 测交  $F_1$  小穗育性(2015)

Fig. 4. Spikelet fertility of the testcrossing  $F_1$  plants from the crosses between HL-Liuqianxin A and the improved lines, HL-Liuqianxin A and C418, respectively(2015).

检测结果,随机选择 6 株基因型为 *Rf1Rf1Rf6Rf6* 的植株、1 株基因型为 *Rf1Rf1rf6rf6* 的单株及对照 C418(*Rf1Rf1rf6rf6*)分别与 HL 型六千辛 A 配组,共获得 8 个测交  $F_1$ 。2015 年正季扬州,成熟后每个测交  $F_1$  群体选取 5 株考查整株小穗育性,计算每个测交系的平均小穗育性,具体结果如图 4。

由图 4 可以看出, C418 与仅带 *Rf1* 的改良系(L1)对 HL 型六千辛 A 的恢复力无显著差异,携带 *Rf6* 的改良系(L2~L7)与 HL 型六千辛 A 的测交  $F_1$

小穗育性均在 90%左右,与对照相比,其测交后代的小穗育性极显著提高( $P<0.01$ )。这些结果初步表明,在 C418 中导入 *Rf6* 能显著增强其对 HL 型粳稻不育系的恢复力。

为进一步研究聚合恢复基因 *Rf6* 对 HL 型粳稻不育系育性恢复的效应及育种利用的可能性,2015 年海南,从  $BC_3F_3$ 、 $BC_4F_2$  株系中随机选取 10 株基因型为 *Rf1Rf1Rf6Rf6* 植株(株号为 SL1~SL10)及 C418 分别与 BT 型、HL 型六千辛 A 杂交,共获得 22 个测交  $F_1$ 。2016 年扬州正季考查测交  $F_1$  小穗育性(表 3)。

由表 3 可见,受体亲本 C418 是 BT 型粳稻恢复系,与 BT 型不育系测交后代育性较高;改良系与 BT 型不育系测交  $F_1$  平均小穗育性较 C418 提高 2%左右,未达显著水平,改良效果不太明显。C418 与 HL 型六千辛 A 测交  $F_1$  的小穗育性为 74.49%,所有聚合 *Rf6* 基因的改良系单株测交  $F_1$  小穗育性平均为 91.58%,较 C418 提高 17.09 个百分点,并且所有改良系测交后代小穗育性与对照相比均极显著提高( $P<0.01$ );大多数改良系对 BT 型、HL 型粳稻不育系的恢复度相近,其中 SL1 和 SL9 对六千辛 A 测交  $F_1$  平均小穗育性已超过 95%。

由以上两年结果可见,通过聚合 *Rf6* 能够改良现有 BT 型粳稻恢复系对 HL 型粳稻不育系的恢复力,使相应的配组后代结实率达到可应用水平。

2.4 改良系主要农艺性状表现

2015 年冬季海南,在 12 个  $BC_3F_3$ , 55 个  $BC_4F_2$  改良株系中,结合田间株型、抽穗期和开花习性等农艺性状目测考查,初步筛选出 6 株基因型为 *Rf1Rf1Rf6Rf6* 且农艺性状与对照 C418 相似的单株;2016 年正季扬州,种植 6 个改良系(编号 G1~G6)及对照 C418。记载各系的生育期,成熟后取样考查 14 个主要农艺性状并与 C418 进行比较分析。

表 3 BT 型、HL 型六千辛 A 测交 F<sub>1</sub> 的小穗育性(2016)

Table 3. Spikelet fertility of the testcrossing F <sub>1</sub> s from BT- and HL-type Liujianxin A, respectively(2016).				%
株系号 Line	基因型 Genotype	BT 型六千辛 A BT-type Liujianxin A	HL 型六千辛 A HL-type Liujianxin A	
SL1	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	91.03±4.98	95.09±1.69**	
SL2	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	91.65±3.06	90.87±1.90**	
SL3	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	92.84±3.72	92.25±3.42**	
SL4	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	94.62±3.13	94.14±2.53**	
SL5	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	95.82±1.75	91.49±3.91**	
SL6	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	92.96±2.00	93.00±1.06**	
SL7	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	97.13±2.02	85.89±7.25**	
SL8	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	94.13±3.51	94.30±2.74**	
SL9	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	94.18±2.25	95.02±2.83**	
SL10	<i>Rf1Rf1Rf6Rf6</i>	93.60±2.28	83.75±8.52**	
C418	<i>Rf1Rf1rf6rf6</i>	91.88±3.02	74.49±5.06	

\*\*表示改良系与 C418 测交 F<sub>1</sub> 的小穗育性存在极显著差异。

All values are listed as mean±SD; \*\*means significant difference in spikelet fertility between F<sub>1</sub>s from the improved lines and C418 at 0.01 probability level.

表 4 改良系与 C418 主要农艺性状比较(2016)

Table 4. Agronomic traits of the improved lines and C418(2016).								
株系 Line	世代 Generation	播始历期 DTH/d	株高 PH/cm	茎粗 CT/mm	单株穗数 PNP	穗长 CPL/cm	主茎穗颖花数 SNC	一次枝梗数 PBN
C418		81	113.3±4.4	6.92±0.65	5.2±1.0	31.0±2.2	346.4±47.6	13.1±1.3
G1	BC <sub>3</sub> F <sub>4</sub>	81	110.0±3.7	7.08±0.44	5.8±1.0	31.3±1.5	368.7±50.1	14.1±1.6
G2	BC <sub>3</sub> F <sub>4</sub>	87	117.4±2.9	7.22±0.66	5.6±1.1	32.6±1.1	294.8±27.3	12.4±0.9
G3	BC <sub>4</sub> F <sub>3</sub>	84	114.7±3.5	7.01±0.51	5.2±0.9	30.1±2.4	343.0±37.9	12.8±1.2
G4	BC <sub>4</sub> F <sub>3</sub>	87	112.4±5.3	7.36±0.47	5.6±0.8	31.6±2.1	357.2±40.7	13.4±1.2
G5	BC <sub>4</sub> F <sub>3</sub>	87	110.6±3.4	6.86±0.39	6.5±0.7	32.3±1.6	305.4±30.6	12.9±1.5
G6	BC <sub>4</sub> F <sub>3</sub>	85	113.6±3.4	7.42±0.32	5.7±0.8	32.9±2.3	389.2±48.4	12.9±1.1

株系 Line	剑叶基角 AFL/°	倒 3 叶长 TLL/cm	倒 2 叶长 SLL/cm	剑叶长 FLL/cm	穗叶差 DPFL/cm	穗颈粗 PND/mm	穗弯曲度 PCD/°
C418	7.7±3.9	52.5±4.9	53.7±4.0	37.7±7.2	-2.6±6.8	2.77±0.18	58.40±13.95
G1	9.6±4.7	55.7±3.2	58.3±4.8	42.5±6.5	-7.2±5.9	2.92±0.20	74.75±18.90
G2	10.0±4.1	60.4±5.2	62.8±4.5	46.6±5.3*	-9.0±4.5	2.80±0.30	88.30±20.41
G3	10.5±3.8	57.6±3.1	56.8±5.9	40.8±6.4	-5.2±5.6	2.84±0.26	71.33±14.21
G4	11.1±7.2	56.3±4.5	56.8±4.8	40.6±6.7	-6.1±7.1	2.80±0.26	82.42±17.76
G5	7.8±5.3	54.6±2.9	54.2±4.8	43.0±4.3	-4.8±4.4	2.84±0.22	67.22±14.67
G6	10.1±5.7	55.1±3.2	59.7±5.1	42.8±6.7	-5.7±6.6	3.08±0.23	71.08±14.01

\*表示与 C418 在 0.05 水平上差异显著。穗叶差—剑叶叶尖与穗尖的高度差。

All values are listed as mean±SD; \* means significant difference at 0.05 probability level, respectively. DTH, Days to heading; PH, Plant height; CT, Culm thickness; PNP, Panicle number per plant; CPL, Length of caulis panicle; SNC, Spikelet number of caulis panicle; PBN, Primary rachis branch number; AFL, Angle between flag leaf and caudex; TLL, Length of the 3rd leaf from top; SLL, Length of the 2nd leaf from top; FLL, Length of flag leaf; DPFL, Vertical distance between panicle tip and flag leaf tip; PND, Panicle neck diameter; PCD, Panicle curvature degree.

由表 4 可以看出, 由于上世代是在海南进行的单株选择, 两地两季气候差异及各单株的光温反应不同, 所选择鉴定的改良系生育期与对照存在较小差异。其他 13 个农艺性状的考查结果表明, 除株系 G2 在剑叶长度上与 C418 存在显著差异外, 大多数聚合系的农艺性状基本回复到 C418 的形态, 说

明本研究分子标记辅助回交育种的效果较好。

3 讨论

生产上, 三系杂交粳稻一直以利用 BT 型不育细胞质为主, 细胞质源单一; 同时 BT 型粳稻不育

系的花粉在三核期败育, 部分不育系的育性不稳定, 这些是制约杂交粳稻发展的因素之一。寻求可用于三系杂交粳稻育种的其他细胞质源能有效克服 BT 型粳稻不育系存在的问题, 促进三系杂交粳稻的发展。本课题组经多年研究发现, 利用 HL 型不育胞质来发展三系杂交粳稻是可行的<sup>[5-8]</sup>。HL 型粳稻不育系可以由 BT 型粳稻保持系转育而成, 选育过程较容易。由于 HL 型不育细胞质主要应用于杂交籼稻中, 已选育的恢复系均为籼型恢复系, 而现有粳稻恢复系均为 BT 型恢复系, 因而选育 HL 型粳稻恢复系是实现 HL 型杂交粳稻生产应用的关键。本课题组为实现 HL 型不育胞质在三系杂交粳稻中的应用, 利用 HL 型粳稻不育系与 BT 型粳稻恢复系进行测交, 结果表明大多数 BT 型恢复系仅对 HL 型粳稻不育系表现出部分恢复的能力<sup>[8, 18]</sup>, 无法应用于生产。因此, 基于现有 BT 型粳稻恢复系来高效选育 HL 型粳稻恢复系对于实现 HL 型杂交粳稻生产利用具有十分重要的意义。

BT型粳稻恢复系利用的恢复基因首先是通过“籼粳架桥”技术从籼稻品种IR8中获得, 并育成了第一个恢复系C57; 在“九五”期间, 再次以此方法育成了粳稻恢复系C418<sup>[19, 20]</sup>。在生产上, 全国大量的BT型粳型恢复系均是以C57、C418或其材料为亲本培育的。据不完全估计, 到20世纪末国内应用的粳稻恢复系60%含有C57的血缘<sup>[21]</sup>, 这造成了BT型粳稻恢复系的恢复基因源十分狭窄。已有遗传分析及BT型育性恢复基因定位结果表明, BT型粳稻恢复系携恢复基因 $Rf1(Rf1a/Rf1b)$ <sup>[9, 10]</sup>, 尚无其他恢复基因定位的报道, 该结果也验证了BT型粳稻恢复系的恢复基因比较单一。生产上, HL型籼稻不育系恢复谱广, 但强恢复系不多, 遗传分析发现大多恢复系只带有1对主效恢复基因 $Rf5$ , 并将其定位在第10染色体上, 该基因与BT型恢复基因 $Rf1a$ 为同一基因<sup>[17-19]</sup>。尽管在籼稻核背景下, 单个 $Rf1a(Rf5)$ 就能够使得HL型籼稻不育系育性恢复正常, 但 $Rf1a(Rf5)$ 对HL型粳稻不育系只具有部分恢复力, 这也是大多数BT型粳稻恢复系对HL型粳稻不育系恢复度不高的原因<sup>[14, 18]</sup>。9311为HL型籼稻强恢复系, 携带有2对恢复基因 $Rf5$ 和 $Rf6$ , 其配制的杂交籼稻组合花粉恢复度达75%, 育性表现稳定<sup>[14, 15]</sup>。 $Rf6$ 为一个新的恢复基因, 位于第8染色体上, 在BT型粳稻恢复系中尚未见利用的报道。本研究利用分子标记辅助选择技术, 将 $Rf6$ 与 $Rf1$ 进行聚合, 共获得67个改良系。测交鉴定表明在现有BT型粳稻恢复系中导入 $Rf6$ 能够显著提高对HL型粳稻不育系的恢

复度, 并且多数改良系对HL型粳稻不育系的恢复度达到BT型杂交粳稻可应用水平, 这表明基于现有BT型粳稻恢复系进行 $Rf6$ 与 $Rf1$ 聚合育种是选育HL型粳稻恢复系的可行途径。

传统的恢复系选育及改良需通过大量测交和育性鉴定来筛选, 工作量大。此外, 小穗育性受环境因素影响较大, 测交 $F_1$ 田间育性鉴定准确性会受到一定的干扰。通过分子标记技术辅助选择, 只对目标基因进行选择, 无需在每个回交世代进行恢复力鉴定, 节省工作量, 提高了育种效率。分子标记辅助选择的准确性主要取决于目的基因与连锁标记的紧密程度, 所用的选择标记与目的基因连锁越紧密, 辅助选择的结果越准确可靠。本研究中所使用的标记RM407与 $Rf6$ 基因紧密连锁, 从测交结果来看, 分子标记辅助选择获得聚合 $Rf6$ 的单株均能表现出对HL型粳稻不育系较强恢复力, 选择的准确度非常高。相关研究结果为今后分子标记辅助选择 $Rf6$ 改良粳稻恢复系的恢复力提供了借鉴。

#### 参考文献:

- [1] 邓华凤, 何强, 舒服, 张武汉, 杨飞, 荆彦辉, 东丽, 谢辉. 中国杂交粳稻研究现状与对策. 杂交水稻, 2006, 21(1): 1-6.  
Deng H F, He Q, Shu F, Zhang W H, Yang F, Jing Y H, Dong L, Xie H. Status and technical strategy on development of japonica hybrid rice in China. *Hybrid Rice*, 2006, 21(1): 1-6. (in Chinese with English abstract)
- [2] Fujimura T, Akagi H, Oka M, Nakamura A, Sawada R. Establishment of a rice protoplast culture and application of an asymmetric protoplast fusion technique to hybrid rice breeding. *J Food Sci*, 2010, 13(3): 243-247.
- [3] 曾千春, 周开达, 朱祯, 罗琼. 中国水稻杂种优势利用现状. 中国水稻科学, 2000, 14(4): 243-246.  
Zeng Q C, Zhou K D, Zhu Z, Luo Q. Current status in the use of hybrid rice heterosis in China. *Chin J Rice Sci*, 2000, 14(4): 243-246. (in Chinese with English abstract)
- [4] 汤述翥, 张宏根, 梁国华, 严长杰, 刘巧泉, 顾铭洪. 三系杂交粳稻发展缓慢的原因及对策. 杂交水稻, 2008, 23(1): 1-5.  
Tang S Z, Zhang H G, Liang G H, Yan C J, Liu Q Q, Gu M H. Reasons and counter measures of slow development on three-line japonica hybrid rice. *Hybrid Rice*, 2008, 23(1): 1-5. (in Chinese with English abstract)
- [5] 汤述翥, 孙叶, 张宏根, 顾燕娟, 陆驹飞, 田舜, 余波, 顾铭洪. 同核异质粳稻不育系特性比较. 中国水稻科学 2005, 19(6): 521-526.  
Tang S Z, Sun Y, Zhang H G, Gu Y J, Lu J F, Tian S, Yu B, Gu M H. Comparison on the characteristics of the isonuclear alloplasmic CMS lines in japonica rice. *Chin J*



- Rice Sci*, 2005, 19(6): 521-526. (in Chinese with English abstract).
- [6] 汤述翥, 张宏根, 朱正斌, 刘超, 李鹏, 梁国华, 严长杰, 刘巧泉, 于恒秀, 顾铭洪. 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(2): 116-124.
- Tang S Z, Zhang H G, Zhu Z B, Liu C, Li P, Liang G H, Yan C J, Liu Q Q, Yu H X, Gu M H. Application of HL type male sterile cytoplasm in *japonica* hybrid rice breeding. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(2): 116-124. (in Chinese with English abstract)
- [7] 汤述翥, 张宏根, 朱正斌, 刘巧泉, 梁国华, 严长杰, 刘超, 李鹏, 顾铭洪. 红莲型不育细胞质应用于粳稻杂种优势的思考与初探. *西南农业学报*, 2009, 22(4): 1158-1164.
- Tang S Z, Zhang H G, Zhu Z B, Liu Q Q, Liang G H, Yan C J, Liu C, Li P, Gu M H. Toward to apply HL-type male sterile cytoplasm for *japonica* heterosis utilization: Consideration and practice. *Southwest China J Agric Sci*, 2009, 22(4): 1158-1164. (in Chinese with English abstract)
- [8] 朱正斌, 张宏根, 刘超, 李鹏, 裔传灯, 汤述翥, 顾铭洪. 四种细胞质六千辛 A 粳稻不育系育种利用特性的比较研究. *作物学报*, 2010, 36(1): 1-8.
- Zhu Z B, Zhang H G, Liu C, Li P, Yi C D, Tang S Z, Gu M H. Comparative study on breeding utilization characteristics of the isonuclear alloplasmic *japonica* CMS lines Liujianxin A with four different cytoplasm sources. *Acta Agron Sin*, 2010, 36(1): 1-8. (in Chinese with English abstract)
- [9] Wang Z, Zou Y, Li X, Zhang Q, Chen L, Wu H, Su D, Chen Y, Guo J, Luo D, Long Y, Zhong Y, Liu Y. 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(3): 676-687.
- [10] Akagi H, Nakamura A, Yokozeki-Misono Y, Inagaki A, Takahashi H, Mori K, Fujimura T. Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(8): 1449-1457.
- [11] Huang Q, He Y, Jing R, Zhu R, Zhu Y. Mapping of the nuclear fertility restorer gene for HL cytoplasmic male sterility in rice using microsatellite markers. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(5): 430-432.
- [12] Huang J, Hu J, Xu X, Li S, Yi P, Yang D, Ren F, Liu X, Zhu Y. Fine mapping of the nuclear fertility restorer gene for HL cytoplasmic male sterility in rice. *Bot Bull Acad Sin*, 2003, 44(4): 285-289.
- [13] Hu J, Wang K, Huang W, Liu G, Gao Y, Wang J, Huang Q, Ji Y, Qin X, Wan L, Zhu R, Li S, Yang D, Zhu Y. 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(1): 109-122.
- [14] Huang W, Hu J, Yu C, Huang Q, Wan L, Wang L, Qin X, Ji Y, Zhu R, Li S, Zhu Y. 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(5): 799-807.
- [15] Huang W, Yu C, Hu J, Wang L, Dan Z, Zhou W, He C, Zeng Y, Yao G, Qi J, Zhang Z, Zhu R, Chen X, Zhu Y. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, 112(48): 14984-14989.
- [16] Zhang H, Che J, Ge Y, Pei Y, Zhang L, Liu Q, Tang S, Gu M. Ability of *Rf5* and *Rf6* to restore fertility of Chinsurah Boro II-type cytoplasmic male sterile *Oryza sativa* (ssp. *japonica*) lines. *Rice*, 2017, 10(1): 2.
- [17] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69-76.
- [18] Zhang H, Zhang L, Si H, Ge Y, Liang G, Gu M, Tang S. *Rf5* is able to partially restore fertility to Honglian-type cytoplasmic male sterile *japonica* rice (*Oryza sativa*) lines. *Mol Breeding*, 2016, 36(7): 102.
- [19] 杨振玉, 陈秋柏, 陈荣芳, 苏正基, 贾宝清, 佟景兴, 王健群. 水稻粳型恢复系 C57 的选育. *作物学报*, 1981, 7(3): 153-156.
- Yang Z Y, Chen Q B, Chen R F, Su Z J, Jia B Q, Tong J X, Wang J Q. The breeding of *japonica* rice restorer C57. *Acta Agron Sin*, 1981, 7(3): 153-156. (in Chinese with English abstract)
- [20] 杨振玉, 张宗旭, 魏耀林, 赵迎春, 高勇. 粳型特异亲和恢复系 C418 的选育及其特性. *杂交水稻*, 1998(3): 33-34.
- Yang Z Y, Zhang Z X, Wei Y L, Zhao Y C, Gao Y. Breeding and characteristics of *japonica* type wide compatibility line C418. *Hybrid Rice*, 1998(3): 33-34. (in Chinese with English abstract)
- [21] 赵迎春, 杨振玉, 魏耀林, 张宗旭. 从 C418 的育成再论北方杂交粳稻的发展形势. *杂交水稻*, 2000(5): 5-6.
- Zhao Y C, Yang Z Y, Wei Y L, Zhang Z X. A second discussion on development of northern *japonica* hybrid rice from the successful breeding of restorer C418. *Hybrid Rice*, 2000(5): 5-6. (in Chinese with English abstract)