

光/温敏核不育系的不育机理及两系杂交稻的发展与展望

汪邑晨 朱本顺 周磊 朱骏 杨仲南*

(上海师范大学 生命科学学院, 上海 200030; *通信联系人, email: znyang@shnu.edu.cn)

Sterility Mechanism of Photoperiod/Thermo-sensitive Genic Male Sterile Lines and Development and Prospects of Two-line Hybrid Rice

WANG Yichen, ZHU Benshun, ZHOU Lei, ZHU Jun, YANG Zhongnan*

(College of Life Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200030, China; *Corresponding author, email: znyang@shnu.edu.cn)

Abstract: This review documented the research progress of two-line hybrid rice in China, and introduced germplasm resources of photoperiod/thermo-sensitive genic male sterile (P/TGMS) lines in two-line hybrid rice breeding. We also summarized various genetic and cellular mechanisms of P/TGMS in plants, and suggestions were proposed for the genetic resource optimization and breeding strategies of P/TGMS lines in two-line hybrid rice breeding.

Key words: rice; two-line hybrid rice; photoperiod/thermo-sensitive genic male sterility

摘 要: 本文回顾了中国两系杂交水稻的发展历史; 介绍了两系法中光/温敏型核不育系遗传资源的发现和选育; 总结了植物中光温敏型雄性不育的遗传学和细胞学机制; 并对水稻两系法中光/温敏型雄性不育系的遗传资源优化及育种策略提出了建议。

关键词: 水稻; 两系杂交稻; 光/温敏核雄性不育

1 两系杂交水稻发展历程

亚洲栽培稻(*Oryza sativa* L.)是全球三大主要粮食作物之一, 是世界一半以上、中国六成人口的主粮^[1]。在过去近百年的时间里, 得益于无数育种专家的不懈努力, 中国水稻育种取得了巨大的进步, 经历了三个重要的发展阶段: 矮化育种、杂交育种以及绿色超级稻的培育, 实现了三次重大的飞跃^[2]。水稻平均产量显著提升, 从 1950 年的 140.5 kg/亩增加至 2022 年的 472 kg/亩(数据来源: 国家统计局)。

杂种优势(heterosis)是指杂交 F_1 代表现出各性状优于亲本的特性, 具体表现为产量、品质、适应性和抗病虫害能力的提升^[3]。杂交育种被认为是提高作物产量最有效的途径^[4]。1926 年, Jones 等^[5]报道了水稻的杂种优势。中国杂交水稻的研究始于 1966 年袁隆平对雄性不育现象的报道^[6]。1970 年, 袁隆平的助手李必湖在海南发现了一株天然细胞质雄性不育株, 并命名为“野败”; 1973 年, 张先程从东南亚品种中找到了可以有效恢复野败育性

的恢复系; 1973 年 10 月, 袁隆平在苏州召开的水稻科研会议上发表了题为《利用野败选育三系的进展》的论文, 标志着中国籼型杂交水稻三系配套成功^[2]。1976 年, 三系杂交水稻开始在全国大面积推广, 杂种优势的利用使中国水稻进入第二次绿色革命。1995 年, 杂交稻种植面积在全国水稻种植面积占比达到历史最高点(68%)^[7]。杂交水稻为中国粮食安全做出了巨大的贡献。

三系法杂交水稻由雄性不育系、保持系和恢复系组成。其中, 细胞质型雄性不育系(Cytoplasmic Male Sterile)因线粒体缺陷而导致花粉败育, 保持系与雄性不育系基因组相同, 但线粒体无缺陷, 恢复系含有恢复基因, 可以恢复雄性不育系的育性^[8]。恢复系和雄性不育系分别作为父母本, 用于生产商业化的杂交种。保持系与雄性不育系杂交后, 其后代依然保持雄性不育的特性, 这使得它们可以用于次年的杂交制种过程^[8]。三系杂交系统已被广泛应用了将近 50 年, 但具有恢复基因的水稻极少, 可作为父本水稻的选择性狭窄, 在一定程度上限制了

收稿日期: 2023-10-25; 修改稿收到日期: 2024-01-02。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2022YFF1003502)。

三系法在生产中的应用^[9]。

细胞核雄性不育(Genic Male Sterile, GMS)由核基因组控制。许多调控减数分裂、绒毡层或雄配子发育的基因一旦发生突变,很容易产生雄性不育。绝大多数核雄性不育材料为完全雄性不育,难以进行纯合不育系的繁衍,因此无法用于杂交制种^[10]。有一部分核不育系的育性受到环境条件影响,称为环境敏感型核雄性不育系(Environment-sensitive Genic Male Sterile, EGMS),其中,光/温敏型核雄性不育系(Photoperiod/Thermo-sensitive Genic Male Sterile, P/TGMS)可以在高温或长日照条件下作为雄性不育系,也可以在低温或短日照条件下表现为可育并进行自我繁殖^[8]。因为P/TGMS系的不育基因受到核基因隐性控制,所以绝大多数的品系都可以作为它的恢复系。1973年,石明松先生在湖北首次发现了光敏感型雄性不育水稻,将其命名为“农垦58S”^[11]。1981年,石明松提出基于农垦58S的特性,通过“两系法”利用杂种优势^[12]。1994年,从农垦58S转育的一系列不育系配组育成的两系杂交组合通过省级审定,标志着中国两系杂交水稻正式进入生产应用阶段^[13]。1995年8月,在湖南怀化召开的两系法杂交中稻现场会上,袁隆平宣布两系杂交水稻取得成功,开始大面积推广^[7]。两系杂交系统是杂交水稻的一项重要创新,并成为中国大规模粮食生产中更受欢迎的方式^[14,15]。2013年,“两系法杂交水稻技术研究与应用”获得了国家科学技术进步奖特等奖。

2 中国两系水稻育种取得的成就

2.1 两系法杂交稻的审定品种数量、种植面积逐年上升

从2002年开始,首批育成的两系超级杂交稻组合“两优培九”种植面积超过广泛应用的三系组合“汕优63”,成为当年推广面积最大的杂交稻^[7]。2009年开始,“扬两优6号”、“Y两优1号”等一批优势组合开始包揽杂交水稻种植面积的前三名^[7]。2012年,两系杂交水稻已经覆盖了约4950万亩的总种植面积,约占杂交水稻总种植面积的三分之一^[16],2016年上升至约50%^[17,18]。根据国家水稻数据中心的统计,自2015年起,两系法国审水稻品种数量开始逐渐超过三系;2017年全国推广面积前十的杂交组合有6个是两系杂交稻,到2019年这个数字上升到了7个;2019—2021年,全国共育成两系水稻不育系403个,占育成的不育系总量

的58.83%,育成两系杂交稻国审品种719个,占育成杂交稻品种的57.34%^[17]。在2023年发布的《国家农作物优良品种推广目录》中有10个骨干型水稻品种,三系和两系品种分别有2个和3个。三个两系杂交水稻品种分别为晶两优534、晶两优华占和隆两优华占。2017—2021年,这三个两系杂交品种累计推广面积达5967万亩,而两个三系杂交品种累计推广面积约1761万亩^[18]。两系杂交稻虽然起步比三系杂交稻晚了近20年,但至今无论从不育系还是杂交品种数量,都已超过了三系杂交稻^[19]。

2.2 两系杂交水稻产量、抗病性和稻米品质超过三系杂交稻

与三系育种相比,两系育种系统的P/TGMS株系具有种质资源广泛、配组自由、杂种优势强、育种生产流程简单等优点。近年来,两系杂交水稻已在中国大规模应用,现有组合的产量、抗性、米质均不同程度优于相应组别的三系杂交水稻或常规水稻对照品种^[4,13]。程本义等^[19]对长江中下游稻区2005—2008年期间进行区试的籼型两系三系杂交组合进行了比较分析,发现两系组合总体上产量高于三系2%~3%,米质总体略优于三系,抗病虫性则与三系相当。林海等^[20]对2015至2020间的国家审定品种区试产量比较中也发现两系优于三系的产量特征,在2020年通过审定的籼型两系杂交稻的平均产量为609.99 kg/亩,籼型三系杂交稻平均产量为589.82 kg/亩。唐世军等^[21]在四川盆地对两系和三系杂交水稻进行田间试验,比较两者在有效穗、穗粒数、千粒重、单穗重及产量上的差异,发现两系杂交水稻的平均产量、有效穗数、结实率高于三系。两系杂交组合的米质总体上也好于三系,历年种植面积在100万亩以上并达到优质食用稻二级以上水平的15个杂交水稻组合中,两系杂交稻有9个(数据来源:《2019年中国水稻产业发展报告》)。

2.3 发挥重要作用的光温敏核不育株系

光温敏核不育系是两系杂交水稻的核心。1994年开始,两系育种快速发展的二十多年时间里,育种家们先后培育出多个重要的光温敏核不育株系。衍生自农垦58S的籼稻品种培矮64S在两系杂交稻推广过程中发挥了重要作用,两优培九是江苏省农业科学院粮食作物研究所以培矮64S为母本,93-11(扬稻6号)为父本育成的超级杂交稻先锋品种,推广初期示范点平均产量超过700 kg/亩,对比全国推广面积第一的三系杂交稻汕优63增产5.1%,大

规模推广至全国后, 平均产量达到了 550 kg/亩, 远超同期全国水稻平均产量 (420 kg/亩) 和杂交水稻平均产量 (470 kg/亩)^[22]。1999 年, 辽宁省农业科学院稻作研究所杨振玉利用广亲和不育系 N422S 和广东优质籼稻品种广占 63 杂交育成了优质光温敏核不育系“广占 63S”^[23], 其衍生不育系广占 63-4S、宣 69S 和新安 S 等在两系推广过程中都发挥了重大作用, 其中广占 63S 与 93-11 配成的“丰两优 1 号”是 2008 年推广面积最大的杂交稻, 广占 63-4S 与 9311 配成的“扬两优 6 号”的推广面积在 2009 年、2010 年、2011 年分别位于杂交稻中的第一、第三和第二^[24]。2003 年, 邓启云等^[25]利用安农 S-1 作为不育基因供体, 通过与常丰 22B、Lemont 杂交、双交, 聚合优质、高光效、抗病、抗逆等优良性状, 再通过与培矮 64S 复交导入优良株叶形态和高配合力实现有利多基因累加, 育成广适性光温敏核不育系“Y58S”。其与 93-11 的组合品种“Y 两优 1 号”在 2004 年的超级稻区试中产量名列第一, 比两优培九增产 11.2%, 并从 2011 年开始取代扬两优 6 号成为全国推广面积最大的杂交稻。2010 年到 2012 年, 湖南亚华种业科学研究院杨远柱选择优质软米不育系湘陵 628S 作为母本, 利用分子标记辅助选择, 将 *Pia*、*Pita* 等抗稻瘟病优质基因聚合在一起, 育成了隆科 638S 和晶 4155S, 成为近两年应用最广泛的不育系^[26, 27]。

3 主要水稻光温敏遗传位点的发现及其作用机理

3.1 农垦 58S 的光敏位点及作用机理

1973 年, 石明松在湖北省沔阳沙湖原种场的农垦 58 群体中发现了一株天然雄性不育水稻, 当地的 35 个品种与其杂交产生的 F₁ 代结实率均保持在 80% 以上, 在 F₂ 代群体中, 可育与不育的分离比接近 3:1, 说明该不育表型受一对隐性核基因控制, 中国农业科学院邓景扬研究员将该基因命名为“光感核不育基因”^[11]。籼型温敏型雄性不育株系培矮 64S 是由农垦 58S 转育而来, 但随着遗传背景从粳稻转移至籼稻, 其育性转换变得更依赖于温度变化而非光照时长。

2012 年, 张启发团队发现了农垦 58S 中 *PMS3* 的一个点突变导致了其光敏表型。*PMS3* 转录产生一个 1236 bp 的长链非编码 RNA, 被称为长日照特异性雄性不育相关 RNA (long-day-specific male-fertility-associated RNA, LDMAR)。不育系中

一个单碱基突变改变了其二级结构, 导致启动子甲基化程度升高, 转录水平下降, 最终造成花药细胞的提前程序性死亡并雄性不育^[28]。同年, 庄楚雄和刘耀光团队在培矮 64S 中定位到其温敏位点为非编码 RNA 基因 *P/TMS12-1*, 后续证实与农垦 58S 中的 *pms3* 为同一突变位点。该团队进一步研究发现 *P/TMS12-1* 转录产物会被切割成 21 核苷酸的非编码小 RNA。该小 RNA 被命名为 *Osa-smR5864*, 在培矮 64S 中产生单碱基替换, 推测该突变会引起功能缺失而导致高温长日照下不育^[29]。

农垦 58S 的另一温敏位点 *pms1* 为不完全显性控制, 位于 7 号染色体, 其幼穗中的转录本在 miR2118 的作用下会被剪切, 生成 21 个核苷酸的阶段性干扰小 RNA (phased small-interfering RNA, phasiRNA)。在农垦 58S 中, miR2118 识别位点附近的一个单核苷酸多态性 (SNP) 导致了在长日照条件下 phasiRNA 的大量积累, 最终通过其他未知机制导致了雄性不育^[30]。

3.2 安农 S-1 的温敏位点及作用机理

1987 年, 邓华凤在 3 个籼稻材料的三交组合 (超 40B/H285//6209-3) F₅ 代群体中, 发现了 1 株天然雄性不育株, 后经不同生态条件下两代选择育成了籼型温敏型雄性不育株系安农 S-1^[31]。2014 年庄楚雄和曹晓凤团队发现其温敏特性由 *tms5* 位点控制, *TMS5* 编码的 RNase Z^{S1} 是一种 RNA 酶, 可以特异性地降解泛素 -60S 核糖体蛋白 L40 基因 (ubiquitin-60S ribosomal protein L40 family, Ub_{L40}) 的 mRNA。在安农 S-1 中, *TMS5* 基因的一个 T 到 A 的单碱基突变导致了该基因在第 71 个碱基对处提前终止。推测安农 S-1 中的 RNase ZS1 功能缺失, 致使高温下 Ub_{L40} 的转录本过度积累, 最终导致雄性不育^[32]。

3.3 衡农 S-1 的温敏位点及其作用机理

1987 年, 湖南省衡阳市农业科学研究所通过杂交, 在长芒野生稻/R0183//测 64 后代中选育出籼型温敏核不育系衡农 S-1^[33]。1989 年该单位将衡农 S-1 与三系恢复系“明恢 63”配组, 育成的两系组合“衡两优 1 号”是早期推广的重要两系品种之一^[34]。2014 年何祖华团队定位到衡农 S-1 的温敏突变位点^[35]。2022 年, 李云海和罗越华团队发现衡农 S-1 的温敏不育表型受 *OsMS1^{wenmin1}* 控制, *OsMS1^{wenmin1}* 与野生型 *OsMS1* 均编码组氨酸结合蛋白, 可以和转录因子 TDR 蛋白互作并激活下游基因的表达。野生型 *OsMS1* 蛋白定位于细胞核内, 但衡农 S-1 中的一个 T 到 C 的单碱基突变改变了 *OsMS1^{wenmin1}* 的亚细胞

定位与丰度,使其定位于细胞核内和细胞质中。高温下,细胞核内的 *OsMS1^{wenmin1}* 水平过低,造成下游基因调控紊乱,最终造成雄性不育^[36]。

3.4 *tms10* 位点及其作用机理

2017年,张大兵团队发现水稻 *tms10* 位点。*TMS10* 编码一个亮氨酸受体激酶,与其同源基因 *TMS10L* 冗余地调控绒毡层细胞的降解。*tms10* 呈现高温不育、低温可育的表型,而 *tms10tms10l* 双突变体呈现不受温度影响的完全雄性不育。在高温下因 *TMS10* 突变导致花药绒毡层无法正常降解导致花药外壁缺陷,但低温可以诱导 *TMS10L* 大量表达,由此弥补 *TMS10* 的功能缺陷并恢复育性^[37]。

3.5 *tms18* 和 *tms15* 位点及其作用机理

2022—2023年,杨仲南团队通过 EMS 诱变和筛选,发现并报道了 *tms18* 和 *tms15* 位点。*OsTMS18* 编码一个葡萄糖-甲醇-胆碱(GMC)氧化还原酶,因其受到花粉外壁形成关键转录因子 *OsMS188* 的直接调控,可能参与了花粉壁的合成。*NP1* 是第三代杂交水稻智能不育系使用的核不育基因^[38], *tms18* 是 *osnp1* 的弱等位突变体, *NP1* 完全敲除会造成不受温度影响的完全雄性不育,而 *tms18* 中一个单碱基突变导致其产生了光温敏表型^[39]。*OsTMS15* 编码一个富亮氨酸重复序列类受体激酶 MSP1,在花药中特异表达,负责启动水稻花药绒毡层的发育。其编码区中 TIR 区段的一个单碱基突变导致了 *tms15* 的温敏表型。*tms15* 的敲除突变体 *tms15-cr* 完全缺失绒毡层细胞, *tms15* 中仍然存在绒毡层,但在高温下绒毡层出现空泡化导致不育,而低温下绒毡层发育正常从而恢复植株育性^[40]。在中花11背景下, *ostms18* 的育性转换温度与 *tms5* 相近,而 *ostms15* 育性转换温度比 *tms5* 更低。

除上述已报道的数个位点外,水稻尚有其他已发现的光/温敏位点,如 *pms2*^[41]、*pms4*^[42]、*tms*^[43]、*tms-1*^[44]、*tms-3*^[45]、*tms4*^[46]、*tms6*^[47, 48]、*ms-h*^[49]等,但目前这些基因位点未能成功克隆,作用机理有待研究。

4 农业生产中应用的光/温敏不育系的位点及系谱分析

中国生产应用的两系核不育系,绝大多数(>95%)由农垦58S、安农S-1、株1S等几种早年选育品种衍生而来^[24]。株1S是杨远柱从抗罗早///科辐红2号/HA79317-7//02428组合的F₂群体中发现的,于1997年育成的偏粳型广亲和温敏不育系^[50]。

从亲缘上看,株1S与安农S-1并无直接关系,但株1S及其衍生的不育系均携带有与安农S-1一样的 *tms5* 温敏位点^[51]。严维等通过全基因组多态性分析发现,株1S及其衍生系与安农S-1及其衍生系,在 *TMS5* 区域和上下游各1Mbp范围内存在多个多态性 SNP 位点和 InDel 标记,说明二者在该功能区段的来源并不相同^[52]。

虽然农垦58S是大多数光温敏核不育系的亲本来源,但根据周海等^[32]的统计,截至2011年,71%的两系杂交组合都依赖于 *tms5* 位点,占据了83.8%的两系杂交稻种植面积。张华丽等^[53]收集了90种光温敏不育系,通过 CAPS 标记和 *Rsa* I 酶切鉴定其携带的光温敏位点,发现衍生自安农S-1和株1S的18个不育系全部携带 *tms5* 位点;完全衍生自农垦58S的47个不育系中,只有12个不育系携带了农垦58S的位点 *pms3*,却有29个不育系携带了 *tms5* 位点,2个不育系携带了 *pms3* 和 *tms5* 两个位点,4个不育系既不携带 *pms3* 也不携带 *tms5*;其他25个不育系中,17个不育系携带了 *tms5* 位点,6个不育系携带了 *pms3* 位点,1个不育系携带了 *pms3* 和 *tms5* 两个位点,1个不育系携带 *osms1^{wenmin1}* 位点。这说明虽然很多不育系由农垦58S衍生而来,但它们的位点已经从 *pms3* 变为了 *tms5*。如广占63S完全由农垦58S衍生而来,但只携带 *tms5* 位点而不携带 *pms3*; Y58S的不育位点来自安农S-1和培矮64S,但只携带 *tms5*^[53]。目前我们尚无法解释遗传谱系和基因位点之间的不一致现象,但推测可能是农垦58S在转育、筛选的过程中混入了含有 *tms5* 位点的种子,并被作为优异单株筛选出来所导致的。轮回422S是1990年到1994年间从7001S与轮回422的杂交后代中混收选育得到的温敏不育系,并没有来自安农S-1或株1S的亲缘^[54],但轮回422S却携带了其亲本均不具有的 *tms5* 位点。以上的研究表明,虽然目前我国光温敏不育系品种众多,但 *tms5* 仍是目前两系杂交水稻育种中最依赖的温敏遗传位点。

5 植物光温敏不育的细胞学机制研究

光温敏型雄性不育是由相关基因突变导致的。近几年来克隆了大量的水稻及拟南芥的光温敏不育基因,从遗传上揭示了光温敏不育的机制。光温敏不育的本质是能否形成有功能的花粉,因此光温敏不育还包含了花粉形成的细胞学机制。在水稻中已经克隆了众多的光温敏不育的基因,在本文第三

部分对这些相关基因作了比较全面的介绍。这些基因的克隆从遗传水平揭示了光温敏不育的机制。迄今为止, 报道的各个水稻光温敏不育系的机理之间缺乏联系和共性。拟南芥作为模式植物, 具有基因组小、自花授粉、种植难度低、繁殖速度快等特点。近几年来, 利用模式植物拟南芥, 人们揭示了光温敏不育的细胞学共性机制, 为水稻光温敏型雄性不育机制的研究以及光温敏不育系的创制提供了理论指导和重要的参考价值。

5.1 花粉外壁的转换过程

在花药发育过程中, 从小孢子母细胞到花粉形成发生一系列的细胞壁转换过程。一般植物细胞壁主要由纤维素和果胶组成, 随着小孢子母细胞的发育, 其细胞壁中的纤维素逐渐降解, 只留下果胶为主的细胞壁(pectin wall)。减数分裂起始前, 在果胶壁和质膜之间会形成由 β -1,3-葡聚糖组成胼胝质壁(callose wall)。种子植物在减数分裂结束后会形成一个四分体(tetrad)结构, 四分体壁由果胶壁和胼胝质壁组成。在四分体的中后期, 初生外壁(primexine)开始在四分体的下层形成, 作为孢粉素沉积的载体。小孢子从四分体释放后, 花粉壁开始形成。花粉壁由花粉外壁(exine)和花粉内壁(intine)组成。花粉外壁由孢子体控制, 进一步分为外壁外层(sexine)和外壁内层(nexine)。花粉外壁外层的主要成分是孢粉素(sporopollenin), 具有保护小孢子/花粉基因组防止紫外损伤的作用。花粉内壁由小孢子自身基因组控制合成, 与一般植物细胞壁组分相似, 主要由纤维素和果胶组成。最后, 绒毡层的降解产物会沉积并镶嵌在花粉外壁的缝隙中, 形成含油层(tryphine)或称为花粉包被(pollen coat), 形成花粉壁。综上所述, 随着花药发育, 花粉在形成过程中, 其细胞壁经过一系列转换过程^[55, 56]。

5.2 光温敏不育大多与细胞壁转换相关

目前拟南芥中已报道了众多的光温敏不育系, 如 *cals5-6*、*rpg1*、*npu-2*、*acos5-2*、*cyp703a2-1*、*abcg26-1*、*rvms-1*、*mgt5* 等^[57, 58]。这些基因均直接或间接与细胞壁转换相关, 其突变体大多表现出细胞壁转换的缺陷。其中, *CALS5* 负责四分体胼胝质壁的形成^[59]; *RPG1*、*NPU* 与初生外壁的形成和质膜波动有关^[60, 61]; 脂酰辅酶 A 合成酶基因 *ACOS5* 和细胞色素 P450 家族基因 *CYP703A3* 分别参与孢粉素中长链脂酰辅酶 A 的合成和长链脂肪酸的羧化^[62, 63]; *ABCG26* 编码一种 ATP 结合盒转运蛋白, 负责孢粉素前体物质转运^[64], 间接参与了花粉外壁的合成; *RVMS* 参与质膜的形成, 间接影响花粉外

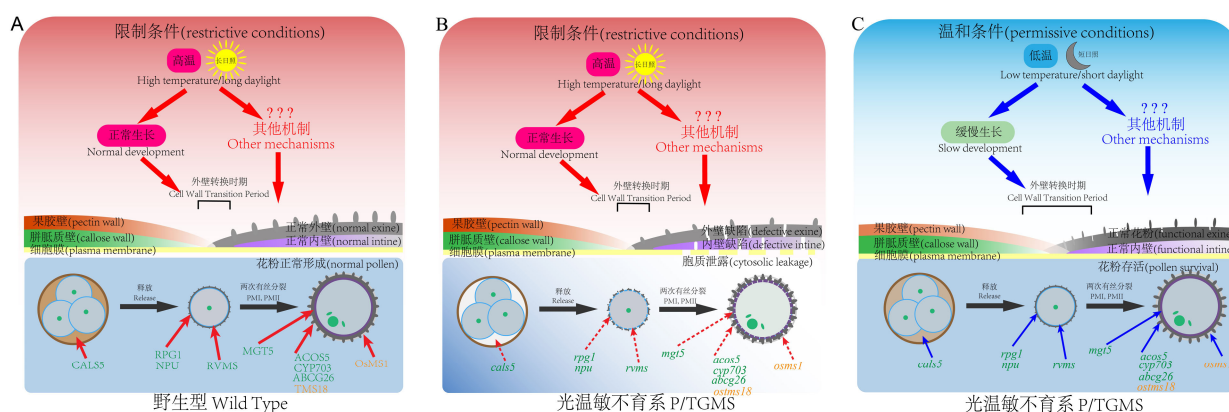
壁内层的形成^[57]; *MGT5* 负责镁离子转运调控花粉内壁形成^[65]。在水稻中也发现了外壁发育相关的光温敏位点, 如温敏突变体 *ostms18* 花粉外壁缺陷, 且 *TMS18* 的表达受到花粉外壁的关键转录因子 OsMS188 的直接调控, 因此推测其也参与了花粉外壁的合成^[39]; OsMS1 作为转录因子调控了一系列曾被报道与花粉壁形成相关的基因, 对花粉壁形成十分重要^[66]; 水稻 *ostms15* 中绒毡层起始缺陷, 间接影响了花粉外壁的形成^[40](图 1)。

5.3 缓慢发育是植物育性转换的通用机制

朱骏等^[67, 68]以拟南芥温敏不育突变体 *rvms-1* (reversible male sterile-1)为研究对象, 发现低温下的小孢子发育进程被减缓。进一步发现编码细胞周期蛋白激酶的 *CDKA;1* (A-TYPE CYCLIN-DEPENDENT KINASE;1)点突变后可以恢复 *rvms-1* 的高温育性。因此将 *CDKA;1* 命名为恢复子 1 (RESTORER OF RVMS 1, RES1)。该基因是雄性配子体发生过程中细胞分裂所必需的。*CDKA;1* 点突变后导致细胞减数分裂用时增加, 延长了小孢子的发育时间。该恢复子还可以恢复 *cals5-6*、*rpg1*、*acos5-2* 等多个温敏突变体在常温下的育性。因此, 低温下缓慢发育是温敏不育系育性恢复的共性机制^[57]。张丞等^[69]发现 *rvms-1*、*cals5-6*、*npu*、*cyp703a2* 等拟南芥温敏突变体在短光周期或低光照强度的条件下也可以恢复育性。短光照或低光强度的条件与低温情况类似, 拟南芥花药发育都明显减缓。因此, 这些温敏不育系也是光敏不育系。光照和温度都通过缓慢发育来恢复这些不育系的育性。

5.4 缓慢发育降低了小孢子对细胞壁保护作用的要求从而恢复育性

温敏不育系 *rvms-2* 恢复子 *res2*、*res3* 的筛选, 进一步解析了缓慢发育恢复光温敏不育系育性的机制。*RES2/QRT3* 编码一种聚半乳糖醛酸酶来分解四分体的果胶壁。在 *res2 rvms-2* 中, 延迟的果胶壁为小孢子的发育提供了额外的保护, 从而恢复 *rvms-2* 的育性^[58]。*RES3/UPEX1* 编码一种阿拉伯半乳糖 β -(1,3)-半乳糖基转移酶。在 *res3* 中, 胼胝质酶 A6 从绒毡层到药室腔的分泌被滞后, 从而延迟了四分体胼胝质壁的降解, 这表明延迟降解的四分体胼胝质壁同样保护了 *rvms-2* 小孢子的发育, 从而恢复育性^[70]。*res2* 和 *res3* 不仅可以恢复 *rvms-2* 的育性, 也可以恢复其他温敏不育系的育性, 说明光温敏不育系通过四分体壁降解的延迟恢复育性是一个普遍机制^[58, 70]。光温敏不育系由于基因的突



光温敏型雄性不育是高温下花粉形成相关基因突变导致的不育。不育系在低温或短光照条件下形成有功能的花粉从而恢复育性，因此是一个细胞学的问题。A：在限制条件（高温/长日照）下，花粉形成经历从四分体壁到花粉壁的细胞壁转换过程。光温敏相关基因保证了细胞壁的转换。B：在限制条件（高温/长日照）下，这些光温敏基因的突变导致细胞壁保护作用下降，无法满足小孢子发育的需求，导致花粉破裂，雄性不育。C：温和条件（低温/短日照）下，缓慢发育导致小孢子发育对细胞壁保护的要求下降。在此情况下，光温敏不育系中的小孢子在基因突变的情况下仍能获得足够的保护，从而形成有功能的花粉，恢复育性。水稻与拟南芥光温敏基因存在很大的差异，提示水稻等作物除了缓慢发育以外还存在其他的机制。图中绿色字体表示拟南芥中发现的光温敏不育基因，黄色字体表示水稻中发现的光温敏不育基因。花粉示意图中的箭头指向表示光温敏基因的影响的细胞壁成分。红色箭头表示野生型光温敏基因可以提供完整的保护。虚线箭头表示光温敏不育系无法提供完整功能。蓝色箭头表示在温和条件下光温敏基因可以为植物提供足够保护。

P/TGMS is caused by genetic mutations related to pollen formation under high temperature. The P/TGMS line forms functional pollen and restores fertility under low-temperature or short-light conditions, making it a cytological issue. A, Under restrictive conditions (high temperature/long photoperiod), the pollen undergoes a cell wall transition process from tetrad wall to pollen wall. P/TGMS genes ensure the proper transition of the cell wall. B, Under restrictive conditions (high temperature/long photoperiod), mutations in these P/TGMS genes reduce the protection of cell wall, leading to insufficient support for the development of microspores and causing pollen rupture, resulting in male sterility. C, Slow development under permissive conditions (low temperature/short photoperiod) reduces the requirements for cell wall protection during microspore development. P/TGMS lines are able to meet the requirements for their wall protection and thus support their development into functional pollens, leading to restored fertility. There are significant differences between rice and *Arabidopsis* in P/TGMS genes, suggesting the presence of a distinct P/TGMS mechanism in rice other than slow development. Green font represents P/TGMS genes in *Arabidopsis*. Yellow font represents P/TGMS genes in rice. The arrows indicate the impact of P/TGMS genes on cell wall components. The red arrow indicates that the P/TGMS gene can provide full protection in the wild type. The dotted arrow indicates the insufficient protection provided by P/TGMS lines. Blue arrows indicate that under permissive conditions, P/TGMS genes can provide sufficient protection for plants.

图1 植物光温敏不育的细胞学机制

Fig. 1. Cellular mechanisms of P/TGMS in plants

变，导致自身的细胞壁保护能力降低，而低温下育性得以恢复表明缓慢发育降低了小孢子对细胞壁保护作用的要求(图1)。

5.5 拟南芥的光温敏机制可能同样适用于水稻

光照和温度是植物生长发育最重要环境因子，低温或短日照条件下植物生长发育速度的减缓是一种普遍现象。水稻在低温或短日照条件下也有发育减缓的现象^[57]。ostms18表现出温敏不育的表型，其在拟南芥中的同源突变体 attms18也存在温敏的表型，具体表现为24℃下可育，28℃下不育。另外，AtTMS18蛋白也与OsTMS18一样定位于绒毡层，这暗示着水稻和拟南芥很有可能具有类似保守的温敏恢复机制^[39]。

张丞等^[69]发现，拟南芥中 rpg1 是一个初生外壁缺陷的温敏不育突变体。低温下因为植物的缓慢

发育，使具有冗余功能的同源基因 Rpg2 能够部分恢复 rpg1 的育性，这与 Yu 等^[37]报道的 TMS10L 在低温条件下作为冗余基因恢复 tms10 突变体育性的机制极为相似。

5.6 水稻光温敏不育突变体中可能存在其他的光温敏机制

拟南芥中许多温敏不育系，如 acos5、cyp703a3、rvms-1、abcg26，在水稻中的同源基因的突变体 osacos12、cyp704b1、rms2、pda1 均表现出不受环境因素影响的完全雄性不育^[71-74]。控制衡农 S-1 光温敏表型的 OsMS1^{wenmin1} 在拟南芥的同源突变体 atms1 也未发现温敏现象^[75, 76]。这种差异很可能与花粉壁的缺陷程度以及所处的生长环境恶劣程度有关。鉴于水稻与拟南芥在生长周期、生长环境和物种分类上存在显著差异，水稻可能具有除缓慢发

育以外的其他温度敏感机制(图 1)。

6 两系杂交稻的问题与展望

从 1973 年光温敏现象被发现以来, 经过几十年的发展, 人们对光温敏现象的理解正在逐步深入。我国的光温敏不育系审定品种数量不断增长, 但这些不育系的基因来源却十分单一, 绝大多数都受到 *pms3* 或 *tms5* 位点的控制。随着两系育种的不断发展, *tms5* 逐渐成为了最主流的光温敏位点。两系法制种极其依赖天气, 因此需要保证十分彻底的高温不育性和尽可能低的育性转换温度。2000 年华中农业大学的人工气候箱育性鉴定结果表明 *tms5* 控制的广占 63S 在高温、长日照下的不育性比 *pms3* 控制的培矮 64S 更好^[23], 吴亚先等^[77]研究了 12 份温敏不育株系的低温敏感性, 发现隆科 638S、晶 4155S 的不育起点温度低于或接近 23℃, Y58S 的不育起点温度达到了 23.0~23.5℃, 广占 63-4S 则高于 23.5℃。这也是 2005 年以后培矮 64S 逐渐被广占 63S 取代, 广占 63S 又逐渐被 Y58S、隆科 638S、晶 4155S 等品种相继取代, 成为应用最广泛的不育系的重要原因之一。

但遗憾的是, 近二十年来, 我国大面积应用的光/温敏不育系仍然高度依赖 *tms5* 位点。尽管 *tms5* 拥有比 *pms3* 更优良的不育性状, 但过于单一的遗传位点很可能增加制种的风险。近年来受到各类极端天气的影响, 夏季常见的台风、突发的异常低温都可能会对两系制种安全造成严重的威胁, 如 2009 年江苏、安徽、四川等地出现多日 24℃左右的低温致使育性波动导致生产事故, 造成了严重的经济损失^[78]。因此, 发现和利用不育性更稳定的光温敏核不育系是两系育种的关键。目前, 育种家的主流解决方案是以 *tms5* 作为基础温敏位点, 利用自然和人工环境, 加压筛选出育性转换温度较低的不育株系。除此之外, 笔者认为还可以采取以下策略:

1) 发掘更多尚未应用的光/温敏不育位点: 如 *tms10*、*tms18*、*tms15* 等。在田间实验中, 粳稻背景下的 *tms15* 表现出了比 *tms5* 更加稳定、彻底的高温不育性^[40]。然而, 即使相同位点在不同的遗传背景下都有可能出现不同的光温敏特性和转换温度, 因此我们需将具有潜力的光温敏株系与主要品种进行杂交配组, 评估其不同遗传背景下的育性转换温度、高温不育性、异交结实率和自交繁殖能力等重要农艺性状。

2) 聚合多个位点: 王芳权等^[79]发现携带 *pms3*

与 *tms5* 双位点的不育株系, 其育性转换温度比只携带 *tms5* 位点的株系更低。这提示我们可以在现有光温敏株系的基础上聚合多个光温敏不育位点, 以创制更加稳定的光温敏不育系。

3) 构建单碱基突变: 通过分析已报道的光温敏不育系可以发现, 除了 *tms5* 和 *tms10*, 大部分光温敏不育位点都是其对应基因的弱等位突变而非敲除突变, 例如 *tms18*、*tms15* 和 *osms1* 的强等位突变就呈现对温度不敏感的完全雄性不育^[36, 39, 40]。目前的证据表明, 光温敏不育植株的育性转换温度, 很有可能和基因的突变强弱呈现一定的相关性。构建单碱基突变, 除了传统的化学诱变等方式, 还可以通过基因编辑。目前最前沿的单碱基编辑(base editing)技术, 如胞嘧啶编辑器(cytidine base editor, CBE)和腺嘌呤编辑器(adenine base editor, ABE)等, 已经实现对单个碱基的精准替换^[80-81]。韩煜等^[40]利用碱基编辑器对 *TMS15* 进行单碱基替换, 创制了 12 个光温敏特性不同的不育株系。前人在水稻与拟南芥中的研究表明, 许多光温敏不育的表型都是由于某些花粉壁发育所必需的关键功能基因的突变所引起。我们可以对某些具有光温敏基因的重要结构域尝试进行有目的、有选择的单碱基替换, 从而获取性状更好、更稳定的光温敏不育株系。

4) 挖掘新的环境敏感型雄性不育系, 如湿度敏感型雄性不育系(humidity-sensitive genic male sterile, HGMS): 漆小泉和周海团队分别报道了湿度影响花粉水合从而改变水稻育性的现象^[82, 83]。在一些气候干燥的内陆地区, 湿度是相比光照和温度是更加稳定可控的环境因素, 湿敏不育系的发现为一些干旱地区农作物的两系制种提供了新的思路。

良好的高温不育性是保证两系杂交制种成功的关键因素, 但不是遴选优质不育系的唯一标准。为了保证不育系的繁种效率, 较低的生育下限温度十分重要。育性恢复临界温度与正常生殖发育的下限温度之间的差值越大, 越能保证不育系的稳定繁殖。另外, 矮而紧凑的株型、良好的柱头外露率与异交结实性, 以及产量、米质的相关性状都是优化两系杂交水稻的重点方向。

近 30 年来, 随着两系法杂交水稻的全面推广, 我国在光/温敏核不育系的选育和应用上取得了很高的成就。虽然两系杂交水稻仍然存在制种风险等问题, 但其自由的配组方式和更低的制种成本仍然获得了无数育种家的青睐, 两系杂交技术是保障国家粮食安全最有效的技术途径之一。为了解决当下的问题, 进一步降低两系杂交水稻的制种风险, 一

方面需要保持对光温敏不育现象的理论研究,从遗传学、分子生物学和细胞学等多角度全面理解光温敏现象的本质;另一方面需要在生产上重点关注不育系的育性转换特性,将现有的理论成果和遗传资源充分应用于生产实践,同时充分利用我国丰富的地理和气候资源,选择合适的地域和时间进行杂交制种与不育系繁种。

谢辞:浙江大学舒庆尧教授为本文修改提出了宝贵建议,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] Huang X, Kurata N, Wei X, Wang Z X, Wang A, Zhao Q, Zhao Y, Liu K, Lu H, Li W, Guo Y, Lu Y, Zhou C, Fan D, Weng Q, Zhu C, Huang T, Zhang L, Wang Y, Feng L, Furuumi H, Kubo T, Miyabayashi T, Yuan X, Xu Q, Dong G, Zhan Q, Li C, Fujiyama A, Toyoda A, Lu T, Feng Q, Qian Q, Li J, Han B. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice[J]. *Nature*, 2012, 490(7421): 497-501.
- [2] 吴比, 胡伟, 邢永忠. 中国水稻遗传育种历程与展望[J]. *遗传*, 2018, 40(10): 841-857.
Wu B, Hu W, Xing Y Z. The history and prospect of rice genetic breeding in China[J]. *Hereditas*, 2018, 40(10): 841-857. (in Chinese with English abstract)
- [3] 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[J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 629-633.
- [4] Yuan L P. Hybrid rice technology for food security in the world[J]. *Crop Research*, 2004(4): 185-186.
- [5] Jones J W. Hybrid vigor in rice[J]. *Agronomy Journal*, 1926, 18(5): 423-428.
- [6] 袁隆平. 水稻的雄性不孕性[J]. *科学通报*, 1966(4): 185-188.
Yuan L P. A Preliminary report on male sterility in rice, *Oryza sativa* L[J]. *Science Bulletin*, 1966(4): 185-188. (in Chinese with English abstract)
- [7] 胡忠孝, 田妍, 徐秋生. 中国杂交水稻推广历程及现状分析[J]. *杂交水稻*, 2016, 31(2): 1-8.
Hu Z X, Tian Y, Xu Q S. Review of extension and analysis on current status of hybrid rice in China[J]. *Hybrid Rice*, 2016, 31(2): 1-8. (in Chinese with English abstract)
- [8] Chen L, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65: 579-606.
- [9] 袁隆平. 杂交水稻发展的战略[J]. *杂交水稻*, 2018, 33(5): 1-2.
Yuan L P. The strategy for hybrid rice development[J]. *Hybrid Rice*, 2018, 33(5): 1-2. (in Chinese with English abstract)
- [10] 欧阳亦聃, 陈乐天. 作物育性调控和分子设计杂交育种前沿进展与展望[J]. *中国科学: 生命科学*, 2021, 51(10): 1385-1395.
Ouyang Y D, Chen L T. Fertility regulation and molecular design hybrid breeding in crops[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2021, 51(10): 1385-1395. (in Chinese with English abstract)
- [11] 石明松. 对光照长度敏感的隐性雄性不育水稻的发现与初步研究[J]. *中国农业科学*, 1985(2): 44-48.
Shi M S. The discovery and study of the photosensitive recessive male-sterile rice[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1985(2): 44-48. (in Chinese with English abstract)
- [12] 石明松. 晚粳自然两用系选育及应用初报[J]. *湖北农业科学*, 1981(7): 1-3.
Shi M S. A preliminary report on selection and application of natural dual-purpose lines of late japonica. *Hubei Agricultural Sciences*, 1981(7): 1-3. (in Chinese with English abstract)
- [13] 杨仕华, 程本义, 沈伟峰, 夏俊辉. 中国两系杂交水稻选育与应用进展[J]. *杂交水稻*, 2009, 24(1): 5-9.
Yang S H, Cheng B Y, Shen W F, Xia J H. Progress of application and breeding on two-line hybrid rice in China[J]. *Hybrid Rice*, 2009, 24(1): 5-9. (in Chinese with English abstract)
- [14] 袁隆平. 两系法杂交水稻研究的进展[J]. *中国农业科学*, 1990(3): 1-6.
Yuan L P. Research progress on two-line hybrid rice[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1990(3): 1-6. (in Chinese with English abstract)
- [15] 斯华敏, 刘文真, 付亚萍, 孙宗修, 胡国成. 我国两系杂交水稻发展的现状和建议[J]. *中国水稻科学*, 2011, 25(5): 544-552.
Si H M, Liu W Z, Fu Y P, Sun Z X, Hu G C. Current situation and suggestions for development of two-line hybrid rice in China[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(5): 544-552. (in Chinese with English abstract)
- [16] Huang J Z, E Z G, Zhang H L, Shu Q Y. Workable male sterility systems for hybrid rice: Genetics, biochemistry, molecular biology, and utilization[J]. *Rice*, 2014, 7: 1-14.
- [17] 郑兴飞, 董华林, 郭英, 殷得所, 王红波, 胡建林, 查中萍, 曹鹏, 徐得泽. 两系法杂交水稻的育种成就与展望[J]. *作物研究*, 2021, 35(5): 509-513.
Zheng X F, Dong H L, Guo Y, Yin D S, Wang H B, Hu J L, Zha Z P, Cao P, Xu D Z. Achievements and prospects of two-line system hybrid rice breeding[J]. *Crop Research*, 2021, 35(5): 509-513. (in Chinese with English abstract)
- [18] 中华人民共和国农业农村部. 国家农作物优良品种推广目录 2023[EB/OL]. (2023-04-18) [2023-8-20] https://www.moa.gov.cn/xw/bmdt/202303/t20230302_6422033.htm.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. National Crop Variety Promotion Catalogue 2023[EB/OL]. (2023-04-18) [2023-8-20] https://www.moa.gov.cn/xw/bmdt/202303/t20230302_6422033.htm. (in Chinese)

- [19] 程本义, 夏俊辉, 沈伟峰. 长江中下游稻区籼型两系与三系杂交水稻组合的比较分析[J]. 杂交水稻, 2009, 24(5): 61-65.
Cheng B Y, Xia J H, Shen W F. Comparison analysis between two-line and three-line indica hybrid rice combinations in the middle and down area of the Yangtse Valley of China[J]. *Hybrid Rice*, 2009, 24(5): 61-65. (in Chinese with English abstract)
- [20] 林海, 李红英, 鄂志国, 庞乾林. 2020 年我国审定的水稻品种基本特性分析[J]. 中国稻米, 2021, 27(6): 6-11.
Lin H, Li H Y, E Z G, Pang Q L. Analysis on Characteristics of Rice Varieties Registered in China in 2020[J]. *China Rice*, 2021, 27(6): 6-11. (in Chinese)
- [21] 唐世军, 吴霞, 文斌, 陶诗顺. 两系和三系杂交水稻产量性状差异性比较[J]. 杂交水稻, 2022, 37(4): 139-142.
Tang S J, Wu X, Wen B, Tao S S. Comparison of difference in yield characters between two-line and three-line hybrid rice[J]. *Hybrid Rice*, 2022, 37(4): 139-142. (in Chinese with English abstract)
- [22] 袁隆平. 超级杂交水稻育种研究的进展 [J]. 中国稻米, 2008, 81(1): 1-3.
Yuan L P. Research progress on super hybrid rice breeding[J]. *China Rice*, 2008, 81(1): 1-3. (in Chinese with English abstract)
- [23] 杨振玉, 张国良, 张从合, 陈金节, 王合勤, 张金家, 严志. 中籼型优质光温敏核不育系广占 63S 的选育[J]. 杂交水稻, 2002, 17(4): 8-10.
Yang Z Y, Zhang G L, Zhang C H, Chen J J, Wang H Q, Zhang J J, Yan Z. Breeding of fine quality PTGMS line Guangzhan 63S in medium indica rice[J]. *Hybrid Rice*, 2002, 17(4): 4-6. (in Chinese with English abstract)
- [24] 斯华敏, 付亚萍, 刘文真, 孙宗修, 胡国成. 水稻光温敏雄性核不育系的系谱分析[J]. 作物学报, 2012, 38(3): 394-407.
Si H M, Fu Y P, Liu W Z, Sun Z X, Hu G C. Pedigree analysis of photoperiod-thermo sensitive genic male sterile rice[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(3): 394-407. (in Chinese with English abstract)
- [25] 邓启云. 广适性水稻光温敏不育系 Y58S 的选育[J]. 杂交水稻, 2005, 20(2): 18-21.
Deng Q Y. Breeding of the PTGMS line Y58S with wide adaptability in rice[J]. *Hybrid Rice*, 2005, 20(2): 15-18. (in Chinese with English abstract)
- [26] 符辰建, 胡小淳, 符星学, 秦鹏, 王凯, 黎琛子, 吴挺飞, 刘珊珊, 杨远柱. 优质抗病高配合力中籼两用核不育系隆科 638S 的选育及应用[J]. 中国稻米, 2021, 27(3): 61-66.
Fu C J, Hu X C, Fu X X, Qin P, Wang K, Li C Z, Wu T F, Liu S S, Yang Y Z. Breeding and application of TGMS line Longke 638S with blast-resistance, good-quality and high combining-ability in middle-season indica rice[J]. *China Rice*, 2021, 27(3): 61-66. (in Chinese with English abstract)
- [27] 符辰建, 胡小淳, 秦鹏, 符星学, 孙振彪, 杨广, 王凯, 杨远柱. 抗病优质高配合力中籼两用核不育系晶 4155S 的选育及应用[J]. 杂交水稻, 2021, 36(4): 18-24.
Fu C J, Hu X C, Qin P, Fu X X, Sun Z B, Yang G, Wang K, Yang Y Z. Breeding and application of medium indica TGMS line Jing 4155S with blast resistance, good grain quality and high combining ability in rice[J]. *Hybrid Rice*, 2021, 36(4): 18-24. (in Chinese with English abstract)
- [28] Ding J, Lu Q, Ouyang Y, Mao H, Zhang P, Yao J, Xu C, Li X, Xiao J, Zhang Q. A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(7): 2654-2659.
- [29] Zhou H, Liu Q, Li J, Jiang D, Zhou L, Wu P, Lu S, Li F, Zhu L, Liu Z, Chen L, Liu Y G, Zhuang C. Photoperiod- and thermo-sensitive genic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA[J]. *Cell Research*, 2012, 22(4): 649-660.
- [30] Fan Y, Yang J, Mathioni S M, Yu J, Shen J, Yang X, Wang L, Zhang Q, Cai Z, Xu C, Li X, Xiao J, Meyers B C, Zhang Q. PMS1T, producing phased small-interfering RNAs, regulates photoperiod-sensitive male sterility in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(52): 15144-15149.
- [31] 邓华凤, 舒福北, 袁定阳. 安农 S-1 的研究及其利用概况[J]. 杂交水稻, 1999, 14(3): 3-5.
Deng H F, Shu F B, Yuan D Y. An overview of research and utilization of Annon S-1[J]. *Hybrid Rice*, 1999, 14(3): 3-5. (in Chinese with English abstract)
- [32] Zhou H, Zhou M, Yang Y, Li J, Zhu L, Jiang D, Dong J, Liu Q, Gu L, Zhou L, Feng M, Qin P, Hu X, Song C, Shi J, Song X, Ni E, Wu X, Deng Q, Liu Z, Chen M, Liu Y G, Cao X, Zhuang C. RNase Z(S1) processes Ubl40 mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4884.
- [33] 蒋佐升, 徐庆国, 董延瑜. 籼型两用不育系衡农 S-1 育性转换及育性遗传的研究[J]. 作物研究, 1992(2): 12-14.
Jiang Z S, Xu Q G, Dong Y Y. Study on fertility conversion and fertility inheritance of indica TGMS line Hengnong S-1[J]. *Crop Research*, 1992(2): 12-14. (in Chinese with English abstract)
- [34] 黄惠芳, 鄂志国, 祁永斌, 管耀祖. 中国两系杂交稻的发展现状及光温敏雄性不育基因研究进展[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(5): 893-899.
Huang H F, E Z G, Qi Y B, Guan Y Z. Current situation for development of two-line hybrid rice in China and research progress of rice photoperiod- and thermo-sensitive genic male sterility gene[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2015, 27(5): 893-899. (in Chinese with English abstract)
- [35] Qi Y, Liu Q, Zhang L, Mao B, Yan D, Jin Q, He Z. Fine mapping and candidate gene analysis of the novel thermo-sensitive genic male sterility *tms9-1* gene in rice [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 127(5): 1173-1182.

- [36] Wu L, Jing X, Zhang B, Chen S, Xu R, Duan P, Zou D, Huang S, Zhou T, An C, Luo Y, Li Y. A natural allele of OsMS1 responds to temperature changes and confers thermosensitive genic male sterility[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2055.
- [37] Yu J, Han J, Kim Y J, Song M, Yang Z, He Y, Fu R, Luo Z, Hu J, Liang W, Zhang D. Two rice receptor-like kinases maintain male fertility under changing temperatures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(46): 12327-12332.
- [38] 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[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(49): 14145-14150.
- [39] Zhang Y F, Li Y L, Zhong X, Wang J J, Zhou L, Han Y, Li D D, Wang N, Huang X H, Zhu J, Yang Z N. Mutation of glucose-methanol-choline oxidoreductase leads to thermosensitive genic male sterility in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(10): 2023-2035.
- [40] Han Y, Jiang S Z, Zhong X, Chen X, Ma C K, Yang Y M, Mao Y C, Zhou S D, Zhou L, Zhang Y F, Huang X H, Zhang H, Li L G, Zhu J, Yang Z N. Low temperature compensates for defective tapetum initiation to restore the fertility of the novel TGMS line *ostms15*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(8): 1659-1670.
- [41] Zhang Q, Shen B, Dai X, Mei M, Saghai Maroof M, Li Z. Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(18): 8675-8679.
- [42] Huang T Y, Wang Z, Hu Y G, Shi S P, Peng T, Chu X D, Shi J, Xiang Z F, Liu D Y. Genetic analysis and primary mapping of *pms4*, a photoperiod-sensitive genic male sterility gene in rice (*Oryza sativa*)[J]. *Rice Science*, 2008, 15(2): 153-156.
- [43] 李仕贵, 周开达, 朱立煌. 水稻温敏显性核不育基因的遗传分析和分子标记定位[J]. *科学通报*, 1999(9): 955-958.
Li S F, Zhou K D, Zhu L H. Genetic analysis and location of molecular markers for thermo-sensitive dominant genic sterility genes in rice[J]. *Science Bulletin*, 1999(9): 955-958. (in Chinese with English abstract)
- [44] Wang B, Xu W W, Wang J Z, Wu W, Zheng H G, Yang Z Y, Ray J D, Nguyen H T. Tagging and mapping the thermo-sensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) with molecular markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91(6-7): 1111-1114.
- [45] Subudhi P K, Borkakati R P, Virmani S S, Huang N. Molecular mapping of a thermosensitive genetic male sterility gene in rice using bulked segregant analysis[J]. *Genome*, 1997, 40(2): 188-194.
- [46] Dong N V, Subudhi P K, Luong P N, Quang V D, Quy T D, Zheng H G, Wang B, Nguyen H T. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(5): 727-734.
- [47] Wang C, Zhang P, Ma Z, Zhang M, Sun G, Ling D. Development of a genetic marker linked to a new thermo-sensitive male sterile gene in rice(*Oryza sativa* L.) [J]. *Euphytica*, 2004, 140(3): 217-222.
- [48] Lee D S, Chen L J, Suh H S. Genetic characterization and fine mapping of a novel thermo-sensitive genic male-sterile gene *tms6* in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(7): 1271-1277.
- [49] Koh H J, Son Y H, Heu M H, Lee H S, McCouch S R. Molecular mapping of a new genic male-sterility gene causing chalky endosperm in rice(*Oryza sativa* L.)[J]. *Euphytica*, 1999, 106(1): 57-62.
- [50] 杨远柱, 符辰建, 胡小淳, 张章, 周永祥, 宋永帮. 株1S 温敏核不育基因的发现及超级杂交早稻育种研究[J]. *中国稻米*, 2007, 80(6): 17-22.
Yang Y Z, Fu C J, Hu X C, Zhang Z, Zhou Y X, Song Y B. Discovery of a thermo-sensitive genic male sterility gene in Zhu 1S and research on the super hybrid breeding of early rice[J]. *China Rice*, 2007, 80(6): 17-22. (in Chinese with English abstract)
- [51] Zhang H L, Huang J Z, Liu Q L, Nawaz Z, Lu H P, Gong J Y, Zhu Y J, Yan W, Shu Q Y. Characterization of an RNase Z nonsense mutation identified exclusively in environment-conditioned genic male sterile rice[J]. *Molecular Breeding*, 2014, 34(2): 481-489.
- [52] 严维, 周涵, 何航, 邓兴旺. 基于全基因组多态性的安农S-1与株1S亲缘关系分析[J]. *杂交水稻*, 2019, 34(1): 57-61.
Yan W, Zhou H, He H, Deng X W. Analysis of the genetic relationship between anong S-1 and Zhu 1S based on genome-wide polymorphism[J]. *Hybrid Rice*, 2019, 34(1): 57-61. (in Chinese with English abstract)
- [53] 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[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(1): 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[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(1): 1-9. (in Chinese with English abstract)
- [54] 李任华, 王象坤, 罗孝和, 罗治华. 光敏核不育系轮回422S的选育[J]. *杂交水稻*, 1995(6): 7-9.
Li R H, Wang X K, Luo X H, Luo Z H. Selection of photoperiod-sensitive male sterile line Lunhui 422S[J]. *Hybrid Rice*, 1995(6): 7-9. (in Chinese with English abstract)
- [55] Yao X, Hu W, Yang Z N. The contributions of sporophytic tapetum to pollen formation [J]. *Seed Biology*, 2022, 1(1): 1-13.

- [56] Xu T, Zhang C, Zhou Q, Yang Z N. Pollen wall pattern in *Arabidopsis* [J]. *Science Bulletin*, 2016, 61(11): 832-837.
- [57] Zhu J, Lou Y, Shi Q S, Zhang S, Zhou W T, Yang J, Zhang C, Yao X Z, Xu T, Liu J L, Zhou L, Hou J Q, Wang J Q, Wang S, Huang X H, Yang Z N. Slowing development restores the fertility of thermo-sensitive male-sterile plant lines[J]. *Nature Plants*, 2020, 6(4): 360-367.
- [58] Shi Q S, Lou Y, Shen S Y, Wang S H, Zhou L, Wang J J, Liu X L, Xiong S X, Han Y, Zhou H S, Huang X H, Wang S, Zhu J, Yang Z N. A cellular mechanism underlying the restoration of thermo/photoperiod-sensitive genic male sterility[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(12): 2104-2114.
- [59] Dong X, Hong Z, Sivaramakrishnan M, Mahfouz M, Verma D P. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2005, 42(3): 315-328.
- [60] Chang H S, Zhang C, Chang Y H, Zhu J, Xu X F, Shi Z H, Zhang X L, Xu L, Huang H, Zhang S, Yang Z N. No primexine and plasma membrane undulation is essential for primexine deposition and plasma membrane undulation during microsporogenesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(1): 264-272.
- [61] Sun M X, Huang X Y, Yang J, Guan Y F, Yang Z N. *Arabidopsis* RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage[J]. *Plant Reproduction*, 2013, 26(2): 83-91.
- [62] de Azevedo Souza C, Kim S S, Koch S, Kienow L, Schneider K, Mckim S M, Haughn G W, Kombrink E, Douglas C J. A novel fatty Acyl-CoA Synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(2): 507-525.
- [63] Morant M, Jørgensen K, Schaller H, Pinot F, Møller B L, Werck-reichhart D, Bak S. CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(5): 1473-1487.
- [64] Quilichini T D, Douglas C J, Samuels A L. New views of tapetum ultrastructure and pollen exine development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Annals of Botany*, 2014, 114(6): 1189-1201.
- [65] Xu X F, Qian X X, Wang K Q, Yu Y H, Guo Y Y, Zhao X, Wang B, Yang N Y, Huang J R, Yang Z N. Slowing development facilitates *Arabidopsis mgt* mutants to accumulate enough magnesium for pollen formation and fertility restoration [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 621338.
- [66] Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, Yang C, Liang W, Zong J, Wilson Z A, Zhang D. *PERSISTENT TAPETAL CELL1* encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 615-630.
- [67] Iwakawa H, Shinmyo A, Sekine M. *Arabidopsis* CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis[J]. *Plant Journal*, 2006, 45(5): 819-831.
- [68] Wijnker E, Harashima H, Muller K, Parra-Nunez P, De Snoo C B, Van De Belt J, Dissmeyer N, Bayer M, Pradillo M, Schnittger A. The *Cdk1/Cdk2* homolog CDKA;1 controls the recombination landscape in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(25): 12534-12539.
- [69] Zhang C, Ren M Y, Han W J, Zhang Y F, Huang M J, Wu S Y, Huang J, Wang Y, Zhang Z, Yang Z N. Slow development allows redundant genes to restore the fertility of *rpg1*, a TGMS line in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2022, 109(6): 1375-1385.
- [70] Wang K Q, Yu Y H, Jia X L, Zhou S D, Zhang F, Zhao X, Zhai M Y, Gong Y, Lu J Y, Guo Y, Yang N Y, Wang S, Xu X F, Yang Z N. Delayed callose degradation restores the fertility of multiple P/TGMS lines in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(3): 717-730.
- [71] Dobritsa A A, Shrestha J, Morant M, Pinot F, Matsuno M, Swanson R, Møller B L, Preuss D. CYP704B1 is a long-chain fatty acid omega-hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(2): 574-589.
- [72] Li Y, Li D, Guo Z, Shi Q, Xiong S, Zhang C, Zhu J, Yang Z. *OsACOS12*, an orthologue of *Arabidopsis* acyl-CoA synthetase5, plays an important role in pollen exine formation and anther development in rice[J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1).
- [73] Zhao J, Long T, Wang Y, Tong X, Tang J, Li J, Wang H, Tang L, Li Z, Shu Y, Liu X, Li S, Liu H, Li J, Wu Y, Zhang J. RMS2 encoding a GDSL lipase mediates lipid homeostasis in anthers to determine rice male fertility[J]. *Plant Physiology*, 2020, 182(4): 2047-2064.
- [74] Zhu L, Shi J, Zhao G, Zhang D, Liang W. Post-meiotic deficient anther1 (PDA1) encodes an ABC transporter required for the development of anther cuticle and pollen exine in rice[J]. *Journal of Plant Biology*, 2013, 56(1): 59-68.
- [75] Wilson Z A, Morroll S M, Dawson J, Swarup R, Tighe P J. The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors[J]. *Plant Journal*, 2001, 28(1): 27-39.
- [76] Ito T, Shinozaki K. The MALE STERILITY1 gene of *Arabidopsis*, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in tapetal cells and is required for pollen maturation[J]. *Plant Cell Physiology*, 2002, 43(11): 1285-1292.
- [77] 吴亚先, 符辰建, 符星学, 孙毛山, 邓冰, 周延彪, 杨远柱. 水稻温敏核不育系株 1S 及其衍生系育性对低温

- 的敏感性差异比较研究[J]. 杂交水稻, 2021, 36(4): 69-75.
- Wu Y X, Fu C J, Fu X X, Sun M S, Deng B, Zhou Y B, Yang Y Z. Comparative studies on the difference of fertility sensitivity to low temperature of Zhu 1S and its derived TGMS lines in rice[J]. *Hybrid Rice*, 2021, 36(4): 69-75. (in Chinese with English abstract)
- [78] 陈立云, 雷东阳, 唐文邦, 肖应辉. 两系法杂交水稻研究和应用中若干问题的思与行[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(6): 641-646.
- Chen L Y, Lei D Y, Tang W B, Xiao Y H. Thoughts and practice on some problems about research and application of two-line hybrid rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2010, 24(6): 641-646. (in Chinese with English abstract)
- [79] 王芳权, 范方军, 夏士健, 宗寿余, 郑天清, 王军, 李文奇, 许扬, 陈智慧, 蒋彦婕, 陶亚军, 仲维功, 杨杰. 水稻光温敏核不育基因 *tms5* 与 *pms3* 的互作效应[J]. 作物学报, 2020, 46(3): 317-329.
- Wang F Q, Fan F J, Xia S J, Zong S Y, Zheng T Q, Wang J, Li W Q, Xu Y, Chen Z H, Jiang Y J, Tao Y J, Zhong W G, Yang J. Interactive effects of the photoperiod-/thermo-sensitive genic male sterile genes *tms5* and *pms3* in rice[J]. *The Crop Journal*, 2020, 46(3): 317-329. (in Chinese with English abstract)
- [80] Wei C, Wang C, Jia M, Guo H X, Luo P Y, Wang M G, Zhu J K, Zhang H. Efficient generation of homozygous substitutions in rice in one generation utilizing an rABE8e base editor [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(9): 1595-1599.
- [81] Zhan X, Lu Y, Zhu J K, Botella J R. Genome editing for plant research and crop improvement [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 3-33.
- [82] Chen H, Zhang Z, Ni E, Lin J, Peng G, Huang J, Zhu L, Deng L, Yang F, Luo Q, Sun W, Liu Z, Zhuang C, Liu Y G, Zhou H. HMS1 interacts with HMS11 to regulate very-long-chain fatty acid biosynthesis and the humidity-sensitive genic male sterility in rice (*Oryza sativa*) [J]. *New Phytologist*, 2020, 225(5): 2077-2093.
- [83] Xue Z, Xu X, Zhou Y, Wang X, Zhang Y, Liu D, Zhao B, Duan L, Qi X. Deficiency of a triterpene pathway results in humidity-sensitive genic male sterility in rice [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 604.