

水稻光温敏核不育系的诱变创制

朱骏¹ 杨延铭¹ 杨仲南^{1,2,*}

(¹上海师范大学 生命科学学院, 上海 200234; ²上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; *通信作者, email: znyang@sjtu.edu.cn)

Mutagenesis and Creation of Photoperiod/Thermo-sensitive Genic Male Sterile Lines in Rice

ZHU Jun¹, YANG Yanming¹, YANG Zhongnan^{1,2,*}

(¹College of Life Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; ²School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; *Corresponding author, email: znyang@sjtu.edu.cn)

Abstract: 【Objective】The two-line hybrid rice breeding technology relies on thermo-sensitive genic male sterile (TGMS) lines carrying the *tms5* locus. This locus originates from a natural mutation and exhibits varying sterility onset temperatures across different genetic backgrounds. Additionally, genetic drift may occur in subsequent generations. Thus, elevated sterility onset temperatures and genetic drift are key bottlenecks restricting the development of two-line hybrid rice technology. 【Method】Using the *japonica* rice variety Zhonghua 11(ZH11) as material, we established a method for creating P/TGMS lines. Rice seeds were treated with ethylmethanesulfonate (EMS), and sterile individuals were screened from the M₂ population under high-temperature conditions. After ratooning, these fertility-restored plants were obtained under low-temperature conditions. 【Result】Through years of experimentation, approximately 10% of the sterile plants were able to self-fertilize under low temperatures. Seeds from these fertility-restored lines were collected and further validated for sterility under high temperatures and fertility under low temperatures. These validated P/TGMS lines were subjected to genetic population construction combined with BSA-seq (Bulked Segregant Analysis sequencing) for gene mapping, resulting in the identification of 18 new P/TGMS lines in the ZH11 background. Among these, *ostms15*, *ostms16*, *ostms18*, and *ostms19* have been published. Notably, the fertility transition temperature of *ostms15* is significantly lower than that of the widely used *tms5* locus in the same genetic background. Currently, more than 20 research institutions have utilized this sterile line for hybrid rice breeding. 【Conclusion】The P/TGMS line creation technology proposed in this study can generate a series of novel P/TGMS lines, potentially overcoming the bottleneck of P/TGMS line scarcity in two-line hybrid rice breeding and supporting the sustainable development of hybrid rice breeding.

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

摘要: 【目的】水稻两系杂交育种技术高度依赖携带 *tms5* 位点的温敏雄性核不育系。该位点源自自然突变, 在不同遗传背景中具有不同的不育起点温度, 而且在后代中可能存在遗传漂变, 所以不育起点温度偏高和遗传漂变是制约水稻两系杂交技术发展的关键瓶颈。【方法】本研究以粳稻中花 11 种子为材料, 建立了光温敏核不育系的创制方法。水稻种子经过化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)诱变处理(M₁)自交收种后, 在高温环境下的 M₂ 群体中筛选出不育单株。将这些不育单株割茬后继续生长, 此时环境温度逐渐降低, 部分新抽穗的植株育性得到恢复。【结果】经多年实验, 约 10% 的不育株在低温条件下能够自交结实。收集这些育性恢复株系的种子, 进一步进行高温不育和低温可育的验证。这些经过验证的光温敏不育系, 采用构建遗传群体结合 BSA-seq (混池分离分析)基因定位方法, 已获得 18 个新的中花 11 背景的光温敏雄性不育位点, 其中 *ostms15*, *ostms16*, *ostms18*, *ostms19* 已经发表。在这些位点中, *ostms15* 不育系的育性转换温度显著低于同样遗传背景下在生产上广泛应用的 *tms5* 不育系, 目前已有 20 多家科研单位将该不育系用于水稻杂交育种。【结论】本研究提出的水稻光温敏不育系的创制技术, 可以获得一系列新型光温敏不育系, 有望彻底突破水稻两系杂交中光温敏不育系缺乏的瓶颈, 助力水稻杂交育种的持续发展。

关键词: 水稻; EMS 诱变; 光/温敏核雄性不育; 两系杂交法

收稿日期: 2025-06-21; 修改稿收到日期: 2025-09-25。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2022YFF1003502)。

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是我国主要的粮食作物之一, 其产量直接关系到粮食安全。目前, 提高水稻产量的主要途径是杂交育种。水稻作为自花授粉作物, 其杂交制种依赖于雄性不育系^[1]。我国杂交水稻育种分为三个发展阶段, 从三系法到两系法再到一系法^[2], 目前一系法处于理论探索阶段^[3]。根据雄性不育系的类型, 三系法应用了细胞质雄性不育系(cytoplasmic male sterile line, CMS)、保持系和配套的恢复系。相较于依赖细胞质雄性不育系的三系法, 两系法通过光温敏核不育系(photoperiod/thermo-sensitive genic male sterility, P/TGMS)突破恢复系-保持系的遗传限制, 展现出更强的配组灵活性, 更容易选育出杂种优势更强的组合, 降低生产成本^[4, 5]。目前, 农业生产上应用的光温敏不育系大多表现为高温或长光照条件下雄性不育, 低温或短光照条件下育性恢复。以细胞核雄性不育为基础的水稻两系杂交法在20世纪90年代逐步走向生产应用^[6-8]。到目前为止, 两系杂交水稻组合的产量、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^[9-10]。近年来的数据表明, 以温敏为主体的两系育种面积已逐渐接近三系育种, 占了水稻种植面积的四分之一左右^[11]。

目前水稻两系杂交主要依赖的核心材料中, 绝大部分光温敏雄性不育品系由安农S-1、农垦58S以及衡农S-1衍生而来。其中, 安农S-1的温敏位点为TMS5, 该基因编码一个保守的核糖核酸酶RNaseZ^{S1}, TMS5蛋白通过作用于下游Ubl40(泛素化核糖体蛋白)参与调控水稻的花粉发育^[12]。后续研究发现, TMS5通过修复2', 3'-环磷-tRNA调节tRNA循环进而调控水稻温敏雄性不育^[13], 并且花药中表达的E3泛素化连接酶通过调控核糖体质量控制通路从而影响tms5育性转换的临界温度^[14-16]。农垦58S是最早发现的光温敏品系, 其控制基因为PMS3(P/TMS12-1)和PMS1, 编码长链非编码RNA(lncRNAs), 亦被称为长日特异性雄性生殖相关RNA(LDMAR)。经测序发现, PMS3(P/TMS12-1)和PMS1基因内部发生点突变, 使得其二级结构发生改变, 与靶基因的匹配降低, 导致光温敏现象^[17, 18]。不同的是, PMS1导致的不育是不完全显性表型, 而PMS3则是隐性表型^[19]。此外, tms9-1是应用品种衡农S1的温敏不育位点, 该位点于2014年被克隆, 该基因编码一个PHD转录因子OsMS1^{wenmin1}^[20]。OsMS1^{wenmin1}基因的第3外显子发生一个点突变, 导致突变体中OsMS1^{wenmin1}蛋白定位的改变和蛋白丰度的降低, 从而造成光温敏不育表型^[21]。值得注意

的是, 这几个光温敏不育系都是在田间偶然发现, 它们的核不育控制位点皆由自然突变所产生。

虽然目前我国光温敏不育系品种众多, 但据统计, 含有tms5位点的光温敏品系大约占生产用品系的83.8%, 表明光温敏雄性不育系遗传位点的应用仍较为单一^[12, 22-23]。近年来, 各类极端天气事件(夏季台风、突发的异常低温)频发, 可能会对两系制种安全造成严重的威胁, 如不少年份在水稻种植正季出现了多日夏季异常低温, 致使育性波动, 引发生产事故, 造成了严重的经济损失^[24]。由于这些生产上面临的瓶颈问题, 在2024年审定的超级稻品种中, 两系杂交稻只有1个(<https://www.ricedata.cn/variety/superice.htm>), 两系杂交体系的发展受到了严重的制约。为此, 应发掘更多光温敏不育新位点, 以解决制种安全性和稳定性相关问题, 从而有效应对水稻两系杂交育种中的产业瓶颈挑战。前期在模式植物中的研究表明, 无论是低温、短光照或是弱光强都会导致发育缓慢, 降低小孢子发育的需求, 进而使光/温敏不育系恢复育性^[25-27]。因此, 发育缓慢是光/温敏不育系的共性机制。水稻作为作物, 较为严苛的田间环境除了发育速度变化之外, ROS的动态变化也是水稻光温敏不育系育性转换的机制^[28, 29]。光温敏不育系的育性转换机制的深入研究对于创制优良的两系不育系至关重要, 挖掘新的不育位点可以为机制解析提供材料。在理论研究的基础上, 建立了大规模化学诱变手段来筛选水稻光温敏不育系。利用该技术筛选到水稻中多个光温敏不育新位点^[28-33], 在本研究中, 我们将介绍该方法的实施流程及技术要点。由于在水稻种植正季, 环境温度由高到低的同时会伴随着光周期逐渐缩短的自然变化, 因此我们认为利用自然环境筛选的光敏/温敏不育系并不是完全受到单一因素影响的, 在本研究中以光温敏表示它们, 并以温度作为筛选指标。

1 材料与方法

1.1 试验材料

诱变材料为亚洲栽培稻粳稻品种中花11野生型的种子, 材料由上海师范大学生命科学学院保存, 该品种具有较高的遗传转化频率和广泛的应用背景。

1.2 化学诱变处理

用甲基磺酸乙酯(Ethyl methane sulphonate, 简称EMS)处理中花11水稻种子。根据半致死条件原

则，选择适宜的处理浓度是至关重要的。因此，我们首先对粳稻中花11野生型的种子进行不同浓度EMS处理(0.6%，0.8%，1.0%，1.2%，1.6%)，结果显示中花11种子的EMS半致死浓度大约在0.8%。实验处理时用0.8% EMS溶液处理湿种子20 h，随后加入1 mol/L的NaOH和20%的Na₂S₂O₃，以终止诱变反应，立即用清水冲洗水稻种子20次以上，随后在室温下浸种48 h，去除水分后将其用湿布包裹置于30℃培养箱中破胸催芽。

1.3 诱变群体的种植

试验在上海市奉贤区的试验田和海南三亚市崖城区南繁基地进行。将诱变后的M₀种子抛秧播种，进行灌溉施肥等田间管理，田间自交结实成熟后可以选择多株混收。

1.4 M₂群体材料中高温不育突变体筛选

在水稻正季与上海试验田中将M₂群体材料抛秧播种，正常进行灌溉施肥等田间管理，待成熟结实后，在田间观察筛选，选择并标记不育突变体，而未观察到育性缺陷的株系不予保留，同时统计突变频率。

1.5 碘-碘化钾染色

取将要开花的花序，剥取其中的花药，在载玻片上滴一滴碘-碘化钾染液，将花药置于染液中夹碎释放其中的花粉，去除多余花药残渣，盖上盖玻片

后在光学显微镜下观察花粉形态和染色情况。

1.6 光温敏不育突变体筛选

将标记的不育突变体株系割茏后，利用秋季环境，使其重新抽穗后通过花粉染色和结实率鉴定其是否为育性恢复突变体，并统计数量。

1.7 突变性状的遗传分析与基因定位

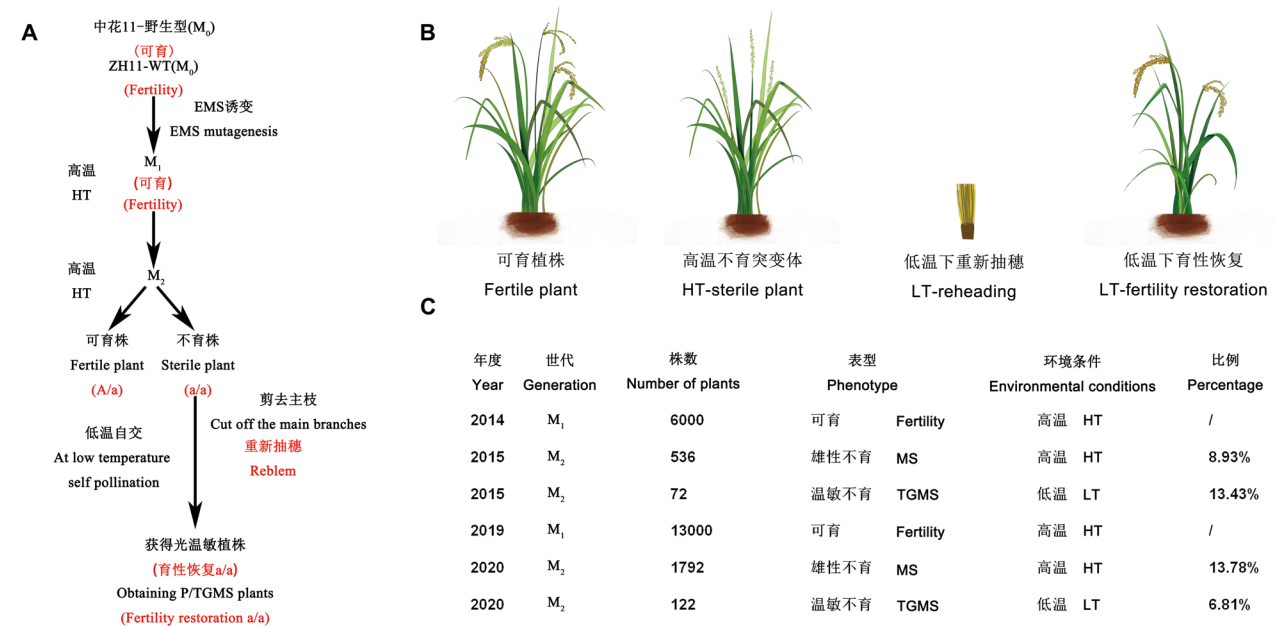
将获得的突变体与野生型中花11杂交，在F₁代中观察显性和隐性表型，在F₂代中统计可育与不育株的遗传分离比，并采样混池后进行高通量测序。获得数据后根据结果2.3部分的方法进行分析。

2 结果与分析

2.1 利用 EMS 诱变筛选光温敏不育系

为了筛选获得水稻光温敏不育材料，我们在2014年和2019年分别做了EMS诱变筛选。待种子发芽后，将M₀种子抛秧播种，统一进行田间管理(图1-A)。2014年在上海正季收获6000株左右M₂种子，2019年在海南获得13000株左右的M₂种子(图1-C)。

在水稻正季(夏季高温条件下)，将M₂水稻种子抛秧于大田中。待9月初M₂植株灌浆，在田间观察并筛选获得不能结穗的水稻不育植株，2015年与2020年在水稻种植正季分别筛选获得雄性不育株



A: 水稻 EMS 诱变流程; B: 筛选流程中不同育性水稻植株; C: 不同批次筛选的数据汇总。
A, Schematic diagram of the EMS mutagenesis process in rice; B, Illustration of rice plants with different fertility during the screening process; C, Summary data of screening across different batches. HT, High temperature; LT, Low temperature.

图1 光温敏水稻 EMS 诱变流程
Fig. 1. EMS mutagenesis process for P/TGMS lines in rice

536 株和 1792 株, 占 M_2 单株数量的 8.93% 和 13.78%(图 1-C)。在同一世代中, 将获得的雄性不育株的成熟穗割去, 统一移栽入规划好的大田中继续让其生长, 继续给水, 适时施肥促穗, 秋季的短日照可以促进水稻开花, 雄性不育株在 10 月进入孕穗期(图 1-B)。在此期间, 利用秋季自然环境下较低的平均气温(18~20 °C)以及较短的日照长度, 抽穗后观察表型, 筛选获得低温下恢复的植株, 统计结实率, 在 2015 年获得的 536 个不育单株中, 共有 72 株恢复育性, 占不育植株的 13.43% 左右。而在 2020 年获得的 1792 个不育单株中, 共有 122 株恢复育性, 占不育植株的 6.81%(图 1-C)。

2.2 光温敏不育系的不育性性状验证

对于上述筛选到的光温敏不育系, 需要对其花粉在高低温下的状态进行验证。在水稻种植正季高温条件下种植一批光温敏不育系, 对其营养生长特征与野生型进行比较, 包括株高、株型、分蘖数、抽穗期, 筛选与野生型无明显差异的植株。待其(约 8 月中旬平均气温 >29 °C)抽穗开花后, 利用碘-碘化钾染色检查花粉育性。鉴定在高温下花粉明显皱缩, 碘染没有花粉或者花粉败育的为雄性不育植株。另在 7 月上旬种植同样光温敏不育系的另一批材料, 待其在低温环境下(10 月上旬平均气温 <23 °C)抽穗开花后, 通过碘染鉴定其花粉在低温下的恢复力, 以此验证这些光温敏不育株系的雄性光温敏不育表型。

作为两系杂交制种核心材料的光温敏不育系, 其不育性对温度的响应决定了其在生产中的实用性。为了鉴定上述筛选获得的光温敏不育突变体对温度的响应情况, 我们连续多年在水稻种植正季的田间比较了这些突变体与同背景下 *tms5* 材料的育性转换情况。每年从五月下旬开始, 每隔一周萌发一批新的材料(分别为野生型、光温敏突变体以及同背景 *tms5*), 萌发后移栽到小盆中, 在人工气候室生长三周后移栽到大田中。待生长到孕穗期后, 记录每一批材料的孕穗和开花的时间以及孕穗期间的平均温度(每天每个小时的实时温度的平均值)。待种子成熟后, 每批材料随机选取 20 个以上的主穗, 统计每批材料的结实率, 以此分析光温敏突变体的高温不育性(图 2-A)。

2.3 光温敏不育位点的定位

将光温敏突变体与野生型回交 1 代后, 在高温季中, 对其 F_2 代遗传分离比进行统计, 挑选 F_2 代群体中可育与不育植株比例为 3:1, 符合隐性单基因控制的群体进行高通量测序。从可育和不育群体中独立随机选取 ≥50 株水稻叶片作为样本, 进行全

基因组混池 BSA 测序。由于是 EMS 突变体库, 我们重点关注 SNP 相关的变异。在重测序数据集中, 每个混池的重测序信息以 VCF(Variant Call Format)文件的形式记录。通过使用 Excel2016 对其中 SNP 数据进行整理和分析, 我们可以获取以下关键信息: 每个 SNP 的基因定位信息(包括基因号、所在染色体、物理定位等)、野生型碱基类型、突变后碱基类型、可育和不育群体中 A 和 a 基因频率(图 3-A)。我们的分析方法基于以下原理: 在可育群体中目标基因存在两种基因型(Aa 和 AA), 由于是随机单株取样, 因此, 在可育群体的混池测序中 A:a 的基因频率为 2:1; 而在不育群体中只有一种基因型(aa), 因此不育群体的混池测序中理论上只能测到 a(图 3-B)。我们使用卡方检验计算每组 SNP 的卡方值(自由度为 1), 设定 P 值小于 0.05(临界卡方值为 3.841)作为显著性标准。具体计算公式如下:

对于可育群体, $\chi^2 = [(A_{\text{频次}}/a_{\text{频次}} - 2)^2]/2$;

对于不育群体, $\chi^2 = [(a_{\text{频次}} - A_{\text{频次}})^2 - (a_{\text{频次}} + A_{\text{频次}})]^2 / (a_{\text{频次}} + A_{\text{频次}})$ 。两者之和即为该 SNP 的卡方值。剔除 χ^2 值大于 3.841 的 SNP 后, 其余 SNP 通过计算相对 P 值并绘制散点图, 初步判断候选基因所在染色体物理定位信息(图 3-C)。进一步分析可能的 SNP 位点所在的基因与水稻育性关系, 筛选出几个候选基因。随后, 在不育群体中对候选基因的 SNP 位点进行单株测序验证, 最终确定最符合条件的候选基因, 并构建其回补载体。利用低温获得的不育系种子进行转基因回补验证, 若回补植株在高温条件下恢复育性, 则确认该位点为新的光温敏不育位点(图 3-D)。

2.4 光温敏不育新位点的分析

在对筛选到的光温敏突变体进行高通量测序以及基因定位后, 本实验室筛选到了 18 个光温敏雄性不育位点。在自然突变的几个光温敏品系中, *TMS5* 位于 2 号染色体上臂, 农垦 58S 中 *PMS1* 位于 7 号染色体, *PMS3* 位于 12 号染色体, 衡农 S1 的控制基因 *OsMSI* 则位于 9 号染色体上。本实验室克隆到的位点在除了 5, 9, 12 号染色体外都有分布, 表明光温敏的控制基因并没有染色体特异性(图 4)。目前在这些位点中有 5 个已报道。*OsTMS15* 编码一个 LRR-RLK 受体激酶, 在 *ostms15* 中其 TIR 基序发生了 GTA (Val) 到 GAA (Glu) 的点突变, 高温条件下, mTMS15 与其配体 TDL1A 的相互作用减少, 突变体绒毡层早期发育异常, 导致雄性不育表型^[31]。*OsTMS18* 编码葡萄糖-甲醇-胆碱 (GMC) 氧化还原酶, *OsTMS16* 编码脂酰辅酶 A 还原酶, 这两个基因参与花粉壁的合成, 高温下突变体中花粉壁

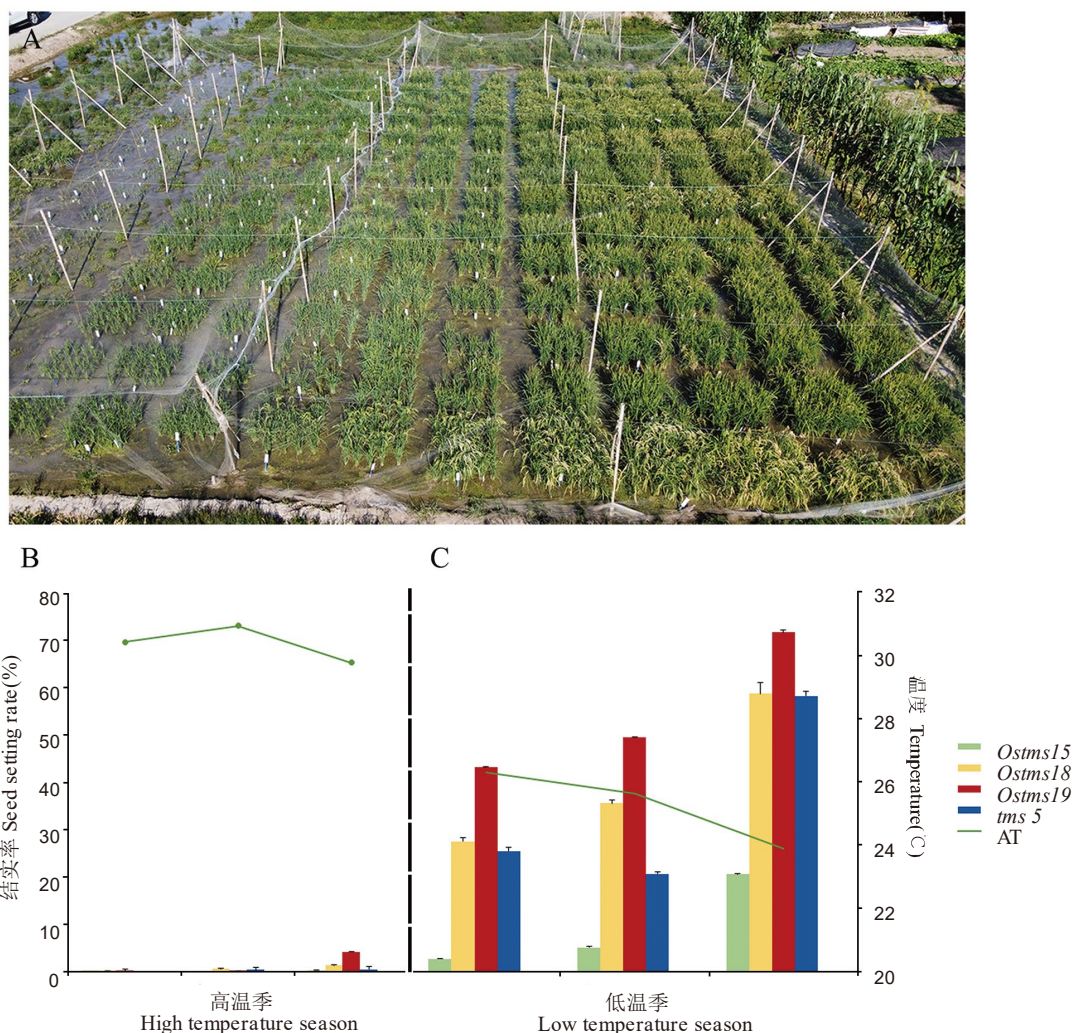


图 2 光温敏水稻不育系的育性性状验证
Fig. 2. Fertility validation of rice P/TGMS lines
 A: 不同时间种植的光温敏不育系; B: 高温条件下三个不同批次的光温敏不育系的结实率统计; C: 低温条件下三个不同批次的光温敏不育系的结实率统计; *ostms15*, *ostms18*, *ostms19*: 本研究筛选到的三个光温敏不育系; *tms5*: 中花 11 背景下的 *tms5* 不育系; AT: 环境温度。
 A, P/TGMS lines planted at different times; B, Seed-setting rate of three different batches of P/TGMS lines under high-temperature conditions; C, Seed-setting rate of three different batches of P/TGMS lines under low-temperature conditions; *ostms15*, *ostms18* and *ostms19*, Three PGMS lines screened in this study; *tms5*, *tms5* sterile line in the ZH11 genetic background; AT, Ambient temperature.

图 2 光温敏水稻不育系的育性性状验证

Fig. 2. Fertility validation of rice P/TGMS lines

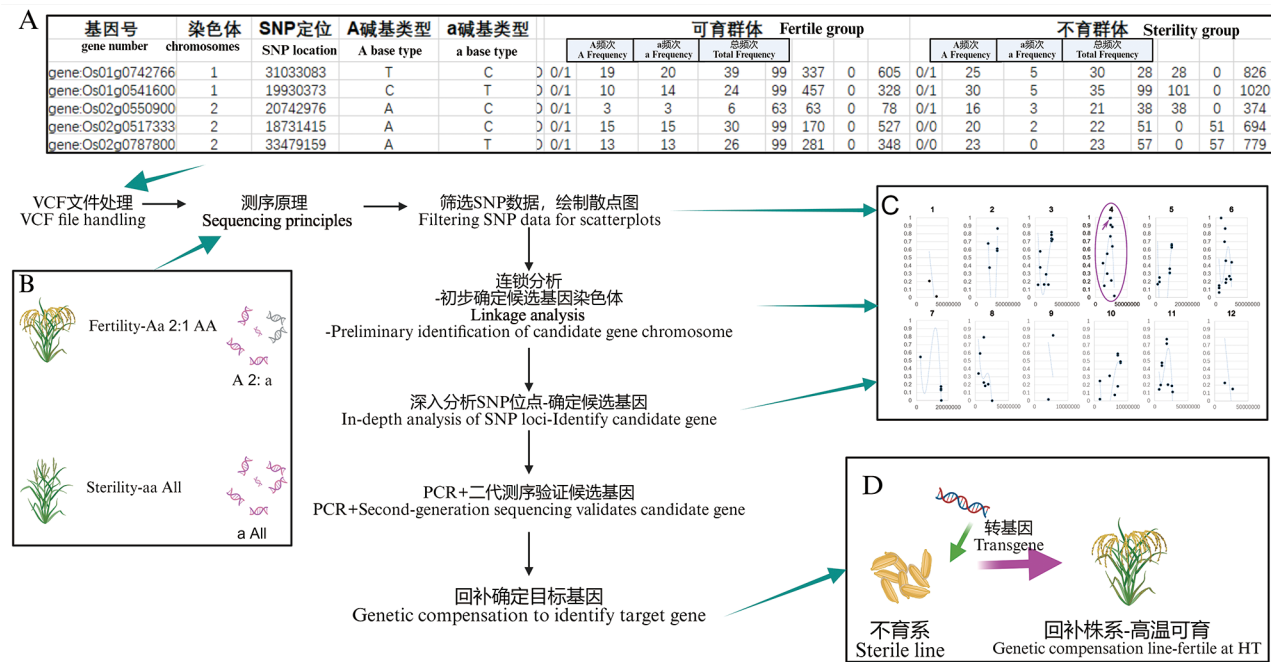
缺陷导致败育, 低温下小孢子的保护需求减小, 育性得到恢复^[28-30]。*OsTMS19* 编码一种定位在绒毡层线粒体的五肽重复序列 (PPR) 蛋白。在高温条件下, *ostms19* 花药中过量的 ROS 积累会破坏花药发育相关基因表达, 导致雄性不育; 而在低温条件下, 花药中 ROS 清除, 从而恢复育性^[29]。另一个光温敏核不育株系 *tfs2* 的表型源于减数分裂交叉形成蛋白 TFS2/HEI10 上一个由亮氨酸突变为苯丙氨酸的点突变^[32]。这些结果表明, 在花药和花粉发育各个阶段的重要事件中的缺陷都有可能导致光温敏不育表型。在这些光温敏不育系中, *ostms15* 在高温下与同背景下的 *tms5* 相比, 显示出良好的不育性, 其中 *ostms15* 的自交结实率为 0 (图 2-B)。随着平均温度的降低, *tms5* 的结实率开始明

显恢复, 自交结实率逐渐达到 50% 以上 (图 2-C), 而在低温季的前两批中, *ostms15* 自交结实率仍在 10% 以下。这些数据表明 *ostms15* 显示出比 *tms5* 更稳定的高温不育性, 说明用此 EMS 诱变的技术方法确实能够在水稻中筛选到更广泛的, 并且起点温度不同的温敏不育位点, 以应对夏季低温潮所造成的杂交制种纯度下降等瓶颈问题。

3 讨论

3.1 利用 EMS 诱变手段能够获得大量的 TGMS 新位点。

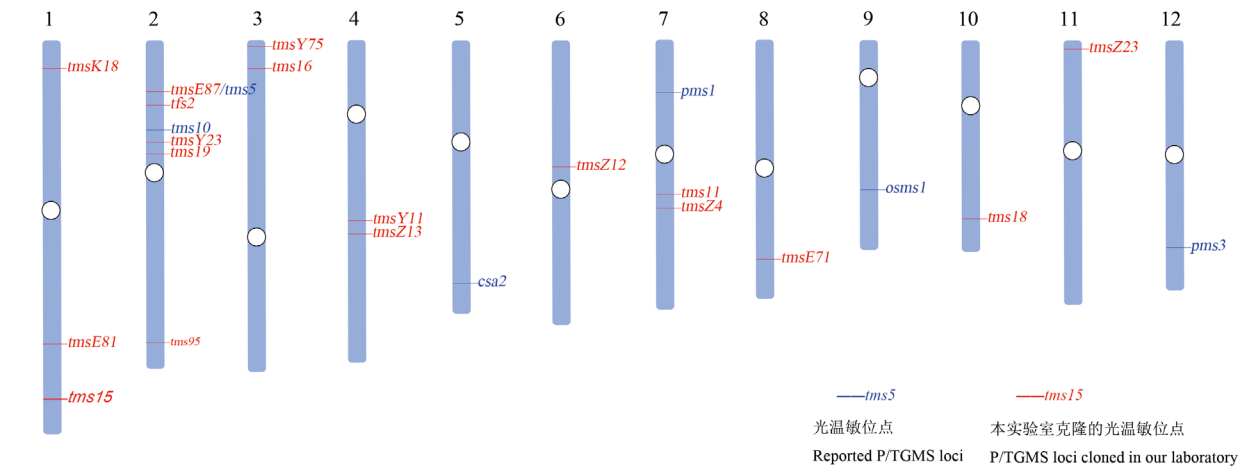
EMS 作为一种化学诱变剂, 通过鸟嘌呤烷基化作用, 引起 DNA 的 C/G 到 T/A 转换, 从而诱发单



A: BSA-seq 原始数据的 VCF 格式文件结构及其关键信息标注; B: 测序分析的遗传学基础; C: 筛选后的 SNP 位点分布，其中紫色圆圈标记了候选基因的连锁区域，紫色箭头标注了进一步分析后确认的候选基因具体位点; D: 回补实验流程及回补植株的性状表现。
A, Structure of VCF format files from raw data of BSA-seq and annotation of key information; B, Genetic basis of sequencing analysis; C, Distribution map of filtered SNP sites, where purple circles mark the candidate gene linkage regions, and purple arrows indicate the specific locus of candidate gene confirmed through further analysis; D, Complementation process and phenotypic performance of complemented plants. HT, High temperature.

图 3 光温敏不育系候选基因 BSA-seq 定位流程

Fig. 3. Mapping process of the candidate gene for P/TGMS lines through BSA-seq



利用本文介绍的 EMS 诱变技术在粳稻中花 11 中克隆到的光温敏位点在水稻 12 条染色体上的分布，蓝色标记为已报道的光温敏位点，红色为本实验室克隆的光温敏新位点。

The localization information of identified P/TGMS loci using the EMS mutagenesis technique described in this study across the 12 chromosomes of rice. Blue markers indicate previously reported P/TGMS loci, while red markers represent new P/TGMS loci cloned in this study.

图 4 利用本技术克隆到的光温敏新位点

Fig. 4. New P/TGMS loci identified using this technology

核苷酸点突变。EMS 诱变具有效率高(能够快速产生大量突变体)、频率高(突变频率较高)、范围广(适用于多种作物)的特点，只要群体量足够，能使其在全基因组范围内随机产生多种位点的突变，已广泛用于构建作物突变体库和创制优异资源^[34, 35]。本研究通过两次大规模的 EMS 诱变筛选后，不育株的

获得率分别为 8.93%和 13.78%，而光温敏不育植株占不育株的 13.43%及 6.81%(图 1)。在自然条件下人工选择到的温敏不育遗传位点中，农垦 58S 中非编码 RNA 突变导致绒毡层中后期的异常发育^[17]，而 *tms5* 突变体的小孢子母细胞发育异常^[12]。利用本文总结的基因定位方法已克隆到了粳型中花 11

品种中近 20 个 TGMS 位点(图 4)。在这些光温敏不育系中,经过定位克隆发现这些基因涉及绒毡层早期分化,减数分裂,花粉外壁的形成以及 ROS 对于小孢子有丝分裂的调控过程等各个花粉发育的生物学事件^[28, 31, 32]。因此,通过本研究所使用的 EMS 诱变技术可以快速获得大量涉及不同发育阶段的光温敏雄性不育材料。

3.2 新位点能够解决两系杂交的瓶颈问题

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,但过于单一的遗传位点很可能增加制种的风险。田间实验数据表明,在本研究筛选获得的光温敏不育系中,涉及绒毡层早期发育的 *ostms15* 表现出了比 *tms5* 更加稳定、更为彻底的高温不育性^[31]。该新型光温敏不育系的发现,能够在两系制种中减少因环境波动导致的制种失败风险,极大提高制种安全性,为两系杂交体系的发展带来革命性变化。前人的研究表明,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^[36]。对于现有的含有 *tms5* 位点的一些高温不育系不稳定的品系,可以将 2 号染色体上臂附近的新位点导入到这些品系中,将两个温敏位点进行连锁改造,有望进一步降低起点温度。目前市场上缺乏粳稻的光温敏不育系,这与 *tms5* 位点在粳稻中的高温不育性较差有关。本研究筛选到的多个基因突变都会造成不同花粉发育阶段的缺陷,因此如果可以在现有光温敏株系的基础上聚合多个光温敏不育新位点,有望创制不育性更加稳定,能够满足杂交粳稻生产需求的光温敏不育系,从而解决粳稻两系杂交育种的产业瓶颈问题。

3.3 此筛选方法也可用于其他水稻品种以及作物光温敏不育系创制

本研究以粳稻中花 11 为背景筛选到光温敏不育系,在其他籼稻品种中,本实验室在适当调整 EMS 浓度后,同样筛选到了有光温敏表型的不育株,目前正在表型考察过程中,说明该方法同样适用于不同背景的野生型水稻品种的光温敏不育株筛选。由于水稻具有强大的分蘖再生能力,因此在水稻中鉴定光温敏不育系可以在同一世代中完成,相对简单。而有些作物,如玉米等不具有割茬再生能力,EMS 诱变仍是一种可行的方法。将 M_2 群体在高温下种植以获得雄性不育突变体,然后与野生型植株杂交产生 F_1 代。 F_1 植株自花授粉形成 F_2 群体,将 F_2 群体在高温和低温条件下种植。同样可以在群体中分离到高温不育和低温可育的潜在光温敏核不育系。此外,番茄等园艺作物原则上可以通

过控制人工气候室的环境筛选光温敏不育系,此方法为提高园艺作物的育种效率提供了一种新思路。同时,由于植物花粉形成的很多生物学过程及其关键控制基因在各物种中相对保守,研究人员可以利用基因编辑的方法直接应用已报道的水稻光温敏位点,以快速创制光温敏不育系。此外,受制于现行法律对自然基因的专利排除规则,对于基因敲除(Knockout)的操作可能难以通过传统专利充分覆盖,但如果是单碱基位点的编辑所造成的突变表型就适用知识产权保护,这也是本筛选方法在知识产权保护方面的优势。

参考文献:

- [1] Cheng S H, Zhuang J Y, Fan Y Y, Du J H, Cao L Y. Progress in research and development on hybrid rice: A super-domesticated in China[J]. *Annals of Botany*, 2007, 100: 959-966.
- [2] 袁隆平. 杂交水稻的育种战略设想[J]. 杂交水稻, 1987(1): 1-3.
Yuan L P. Breeding strategy for hybrid rice[J]. *Hybrid Rice*, 1987(1): 1-3. (in Chinese with English abstract)
- [3] Khanday I, Skinner D, Yang B, Mercier R, Sundaresan V. A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds[J]. *Nature*, 2019, 565(7737): 91-95.
- [4] Chen L, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65(1): 579-606.
- [5] 程式华, 孙宗修, 斯华敏, 卓丽圣. 水稻两用核不育系育性转换光温反应型的分类研究[J]. 中国农业科学, 1996(4): 12-17.
Cheng S H, Sun Z X, Si H M, Zhuo L S. Classification of light-temperature-responsive types for fertility conversion in dual-purpose nuclear sterile lines of rice[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1996(4): 12-17. (in Chinese with English abstract)
- [6] 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[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 1981(7): 1-3. (in Chinese with English abstract)
- [7] 袁隆平. 两系法杂交水稻研究的进展[J]. 中国农业科学, 1990, 23(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)
- [8] 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)
- [9] 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 of basic characteristics of rice varieties to be validated in China in 2020[J]. *China Rice*, 2021, 27(6): 6-11. (in Chinese with English abstract)
- [10] 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)
- [11] 中国水稻研究所. 2019年中国水稻产业发展报告[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2019: 169-170.
China Rice Research Institute. China Rice Industry Development Report 2019 [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2019: 169-170.
- [12] 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.
- [13] Yan B, Liu C, Sun J, Mao Y, Zhou C, Li J, Liu W, Li S, Yan W, Fu C, Qin P, Fu X, Zhao X, Song X, Nie J, Gao F, Yang Y, Chen Y, Cao X. Impaired 2', 3'-cyclic phosphate tRNA repair causes thermo-sensitive genic male sterility in rice[J]. *Cell Research*, 2024, 34(11): 763-775.
- [14] Peng G, Liu M, Zhu L, Luo W, Wang Q, Wang M, Chen H, Luo Z, Xiao Y, Zhang Y, Hong H, Liu Z, Zhou L, Guo G, Wang Y, Zhuang C, Zhou H. The E3 ubiquitin ligase CSIT1 regulates critical sterility-inducing temperature by ribosome-associated quality control to safeguard two-line hybrid breeding in rice[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16: 1695-709.
- [15] Peng G, Liu M, Luo Z, Deng S, Wang Q, Wang M, Chen H, Xiao Y, Zhang Y, Hong H, Zhu L, Liu Z, Zhou L, Wang Y, Zhuang C, Zhou H. An E3 ubiquitin ligase CSIT2 controls critical sterility-inducing temperature of thermo-sensitive genic male sterile rice[J]. *New Phytologist*, 2024, 241: 2059-2074.
- [16] Zhou C, Liu C, Yan B, Sun J, Li S, Li J, Wang J, Huang X, Yan W, Yang S, Fu C, Qin P, Fu X, Zhao X, Wu Y, Song X, Wang Y, Qian W, Yang Y, Cao X. tRNA selectivity during ribosome-associated quality control regulates the critical sterility-inducing temperature in two-line hybrid rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2025, 122(6): e2417526122.
- [17] 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*, 2012, 109: 2654-2659.
- [18] 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: 649-660.
- [19] 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. *PMSIT*, producing phased small-interfering RNAs, regulates photoperiod-sensitive male sterility in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113: 15144-15149.
- [20] 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: 1173-1182.
- [21] 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 *OsMSI* responds to temperature changes and confers thermosensitive genic male sterility[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 2055.
- [22] 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)
- [23] 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)
- [24] 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)
- [25] 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.
- [26] Zhang C, Xu T, Ren M Y, Zhu J, Shi Q S, Zhang Y F, Qi Y W, Huang M J, Song L, Xu P, Yang Z N. Slow development restores the fertility of photoperiod-sensitive male-sterile plant lines. *Plant Physiology*. 2020, 184(2):923-32.
- [27] 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.
- [28] Wang Y C, Liu X L, Zhang Z, Zhou L, Zhang Y F, Zhu B S, Yang Y M, Zhong X, Su Z X, Ma P Y, Huang X H, Yang Z N, Zhu J. The residual activity of fatty acyl-CoA reductase underlies thermo-sensitive genic male sterility in rice[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2025, 48(2): 1273-1285.
- [29] Zhou L, Mao Y C, Yang Y M, Wang J J, Zhong X, Han Y, Zhang Y F, Shi Q S, Huang X H, Meyers B C, Zhu J, Yang Z N. Temperature and light reverse the fertility of rice P/TGMS line *ostms19* via ROS homeostasis[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22: 2020-2032.
- [30] 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: 2023-2035.
- [31] 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: 1659-1670.
- [32] Zhang Z, Guo Y Y, Wang Y C, Zhou L, Fan J, Mao Y C, Yang Y M, Zhang Y F, Huang X H, Zhu J, Zhang C, Yang Z N. A point mutation in a meiotic crossover formation gene *HEI10/TFS2* leads to thermos-sensitive genic female sterility in rice[J]. *The Plant Journal*, 2024, 118: 506-518.
- [33] 汪邑晨, 朱本顺, 周磊, 朱骏, 杨仲南. 光/温敏核不育系的不育机理及两系杂交稻的发展与展望[J]. *中国水稻科学*, 2024, 38(5): 463-474.
Wang Y C, Zhu B S, Zhou L, Zhu J, Yang Z N. Sterility mechanism of photoperiod/thermo-sensitive genic male sterile lines and development and prospects of two-line hybrid rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2024, 38(5): 463-474. (in Chinese with English abstract)
- [34] Till B J, Reynolds S H, Greene E A, Codomo C A, Enns L C, Johnson J E, Burtner C, Odden A R, Young K, Taylor N E, Henikoff J G, Comai L, Henikoff S. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING[J]. *Genome Research*, 2003, 13(3):524-30.
- [35] 叶俊, 吴建国, 杜婧, 郑希, 张志, 石春海. 水稻“9311”突变体筛选和突变体构建[J]. *作物学报*, 2006, 32(10): 1525-1529.
Ye J, Wu J G, Du J, Zheng X, Zhang Z, Shi C H. The screening of mutants and construction of mutant population for cultivar “9311” in rice (*Oryza sativa* L)[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(10): 1525-1529. (in Chinese with English abstract)
- [36] 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]. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(3): 317-329. (in Chinese with English abstract)