

含玉米 *pepc* 基因恢复系的 MAS 转育及其杂交稻的光合特性和杂种优势研究

李季航^{1,2,3} 向珣朝^{1,2,4} 何立斌^{1,2} 张楷正^{1,2} 李平^{1,2,*}

(¹ 四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130; ² 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室/四川农业大学, 四川雅安; ³ 四川省农业技术推广总站, 四川成都 610041; ⁴ 西南科技大学, 四川绵阳 621000)

摘 要: 用玉米 *pepc* 基因的特异性引物对转育 *pepc* 基因的后代材料进行分子标记辅助选育 (MAS), 成功地培育出与轮回亲本蜀恢 881 遗传相似度达 97.09% ~ 99.03% 的改良蜀恢 881, 用此改良恢复系与 3 个不育系组 46A、776A、2480A 形成组合。结果表明, (1) 自行设计的 *pepc* 基因特异性引物能对基因进行准确的筛选, 而且玉米 *pepc* 基因在新的遗传背景下能够稳定遗传和高水平表达; (2) 含有 *pepc* 基因 F₁ 的 PEPCase 活力明显地高于对照, PEPCase 活力与净光合速率 (P_n) 极显著正相关 (0.6081**), 表现量子效率、羧化效率等光合指标也显著好于对照; (3) 含有 *pepc* 基因 F₁ 农艺性状表现各不相同, 但千粒重和单株产量表现较为一致, 且单株产量较对照平均增加 41.48%; (4) 776A、Line 1 和 Line 6 的 GCA 较高, 值得今后进一步考察与利用。

关键词: MAS; 杂交稻; 玉米 *pepc* 基因; 光合特性; 高光效育种

中图分类号: S511

Photosynthetic Characteristics and Heterosis in Transgenic Hybrid Rice with Maize Phosphoenolpyruvate Carboxylase (*pepc*) Gene by MAS

LI Ji-Hang^{1,2,3}, XIANG Xun-Chao^{1,2,4}, HE Li-Bin^{1,2}, ZHANG Kai-Zheng^{1,2} and LI Ping^{1,2,*}

(¹ Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, Sichuan; ² Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resource and Improvement (Sichuan Agricultural University), Ministry of Education, Ya' an 625014, Sichuan; ³ General Station for Extending Agriculture Technology in Sichuan, Chengdu 610041, Sichuan; ⁴ Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, Sichuan, China)

Abstract: Posterity materials carrying maize *pepc* gene has been successfully applied into marker-assisted selection (MAS) by using specific primer of maize *pepc* gene, and the improved Shuhui 881 with *pepc* gene has been obtained. The improved Shuhui 881 was similar to its backcross parents in genetic background with 97.09%~99.03%. Then rice sterile lines Gang 46A, 776A, 2480A as the female parents were crossed with several improved Shuhui 881 above. Some progress on photosynthetic characteristics and agronomic traits in hybrid rices with *pepc* gene were achieved. Firstly, Maize *pepc* gene not only could be correctly screened by MAS using specific primer designed by BLAST, but also was stably inherited and had PEPCase activity highly expressed in different genetic backgrounds. Secondly, PEPCase activity increased significantly as compared with respective controls and there was a significant correlation (0.6081**) between PEPCase activity and P_n in hybrid rice with *pepc* gene. Thirdly, the photosynthetic indexes of transgenic hybrid rice such as apparent quantum yield (AQY), carboxylation efficiency (CE), were obviously superior to respective controls. Moreover, the performances in agronomic traits varied among hybrid rice with *pepc* gene except in 10³-grain weight and grain yield per plant. Transgenic hybrid rice increased by average of 41.48% in grain yield per plant as compared with controls. And finally, according to

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2003AA212030, 2004AA207110)和教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0453)资助。

作者简介: 李季航(1980-),男,硕士研究生,E-mail:lijihang@sohu.com

* 通讯作者(Corresponding author):李平,教授,博导,研究方向为水稻遗传育种与分子生物学。E-mail: liping@cngk.com;

Tel: 028-82721612; Fax: 028-82726875

Received(收稿日期): 2006-01-09; Accepted(接受日期): 2006-05-25.

the effect analysis of general combining ability (GCA), the 776A, Line 1 and Line 6 had outstanding performances, which was worth of further study in the future.

Key words: Marker-assistant selection (MAS); Hybrid rice; Maize *pepc* gene; Photosynthetic characteristic; High photosynthetic efficiency breeding

一般来说,现有水稻推广品种的光能利用率在1.0%~1.5%之间,而理想的光能利用率在3%~5%^[1]。在高O₂、高光强以及低CO₂条件下,C₄植物与C₃植物相比具有较高的光合效率、低光呼吸和高效水分及氮素利用率。生理学家和育种家们曾尝试用传统C₃与C₄植物的杂交,期望得到具C₄高光效特性的C₃植物,其间也取得了一些进展^[2-3],但遗憾的是大多数C₄植物与C₃植物的杂交均未能获得预期的效果^[4]。随着DNA重组和基因工程技术的飞速发展,利用C₄途径关键酶基因在C₃植物特定组织器官的高表达来促进C₃植物光合作用的改善已成为可能。从玉米、高粱、苋菜等C₄植物中克隆的C₄光合循环基因如PEPC、NADP-Me、PPDK^[5]已经转入水稻^[6-8]、马铃薯^[9-10]、烟草^[11]、拟南芥^[12-13]等C₃植物,并得到了不同程度的表达。*pepc*基因为C₄光合循环关键酶基因,这一“CO₂泵”的存在有效增加了对CO₂的亲合力,提高了Rubisco的羧化活性,进而减少光呼吸。*pepc*基因已由Ku等^[6]成功地导入水稻,该基因的表达水平相当于或高于玉米。一系列光合生理特性的研究表明^[14],转*pepc*基因种质具有较高的净光合速率和光保护效应。此外,李霞、王德正等^[15-17]都曾使用此高表达的转*pepc*基因种质与我国杂交水稻的亲本进行杂交,F₁的高PEPCase活力和高光效特性显示了现代生物技术与常规育种技术结合转移高光效特性的可能性,但转基因原种Kitaake在农艺性状上的缺陷限制了其在育种中的直接利用,我们利用高光效的转基因种质,以西南地区广泛使用的籼型恢复系蜀恢881为基因受体,经多年回交,通过自行BLAST设计的*pepc*基因特征性引物进行MAS,并参考光合酶活性表现,获得了遗传背景与蜀恢881相似度达97.09%~99.03%的转基因改良蜀恢881。研究表明^[18],*pepc*基因在新的遗传背景中能够稳定地遗传和表达。本试验利用与蜀恢881背景遗传相似度达97.09%~99.03%的6个单株后代分别与3个不育系C46A、776A、2480A配组,考察了F₁的光合生理与农艺性状表现,以期

为高光效育种提供参考。

1 材料与与方法

1.1 供试材料

以转玉米C₄型*pepc*基因水稻Kitaake(江苏农科院焦德茂研究员提供)为基因供体,籼型恢复系蜀恢881(881R)为受体,于2000年夏在南京杂交,通过四川温江、海南陵水两地不断回交,结合自行设计的*pepc*基因的特异性引物进行分子标记辅助筛选(MAS),参考光合、酶活等生理指标的情况,选育出高世代含玉米C₄型*pepc*基因的改良蜀恢881,简称881P,选育过程见图1。在BC₂F₂代选出含有*pepc*基因且综合农艺性状较好的6个单株进行遗传背景分析,结果表明,6株881P与881R的相似度达97.09%~99.03%,选中6个单株后代(BC₂F₃)*pepc*基因PCR反应的阳性株和3个3系不育系冈46A(以下简称G46A)、776A、2480A于2005年春海南陵水作杂交,同时用881R与上述3个不育系杂交所得F₁为对照,即G46A/881R(CK₁)、776A/881R(CK₂)和2480A/881R(CK₃)。

1.2 PEPCase活力测定

参照Kung^[19]和Gonzalez等^[20]的方法取0.25g水稻叶片(去叶脉),加适量提取介质(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、1 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA、5%甘油),迅速充分研磨,13 000×g冷冻离心10 min,取上清液分析酶活力,反应总体积为1 mL,含50 mmol/L Hepes-KOH (pH 8.0)、10 mmol/L NaHCO₃、5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L NADH、以及2 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)、1.5 U苹果酸脱氢酶(MDH),以PEP的加入开始计时,记录340 nm光密度的变化,记录5次共1 min,计算PEPCase活力。以上整个过程均在冷冻条件下进行。用株系6(Line 6)与3个不育系形成的F₁为代表作为PEPCase活力指标测定的材料,测定齐穗期的倒2叶,每个样品测5株,2个重复。

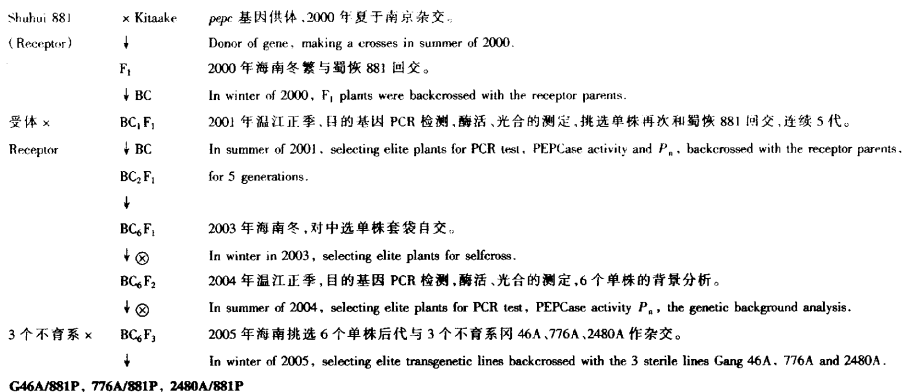


图 1 含有 *pepc* 基因改良蜀恢 881 的选育经过及其与 3 个不育系的组配

Fig.1 Procedure for selection of improved Shuhui 881 with *pepc* gene and making a cross with 3 sterile lines

1.3 光合指标测定

净光合速率 (P_n) 测定用美国 LI-COR 公司 LI-6400 型便携式光合作用测定系统。测定时间为上午 10:00 ~ 11:30。叶室 CO₂ 浓度 400 μmol·mol⁻¹, 光通量密度 (PFD) 1 200 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度 30℃。抽穗期测定 P_n 对 PFD 的响应曲线, 参数设定为温度 30℃, 叶室 PFD 梯度为 50、150、200、400、600、800、1 000、1 200、1 500 μmol·m⁻²·s⁻¹, CO₂ 浓度为 400 μmol·mol⁻¹, 由曲线可得表观光量子效率、光补偿点和光饱和点时的 P_n。之后设定叶室 CO₂ 浓度梯度为 400、300、200、150、100、50、400、400、600、800、1 000、1 200 μmol·mol⁻¹, PFD 1 200 μmol·m⁻²·s⁻¹, 通过 P_n 对 CO₂ 的响应曲线, 求羧化效率、CO₂ 补偿点和 CO₂ 饱和点时的 P_n, 整个测定过程都在闭合气路系统下自动进行, 测定时期、方法和材料与 PEPCase 活力指标测定相同。

1.4 目的基因的检测与遗传背景分析

DNA 提取采用王珍^[21] 的 SDS 微量方法, 稍加改进。实验所采用的 C₄ 型 *pepc* 基因特异引物由本实验室用 BLAST 设计, 其正向引物为 5'-AAG CAG CGA AGC GAG ACG-3', 反向引物为 5'-GAT TGC CGC CAG CAG TAG-3', 扩增片段长度为 311 bp, 其所在位置见图 2。PCR 反应体系 25 μL, 含 10 × 反应缓冲液 2.5 μL, dNTP 2.0 μL (2.5 mol/L), 引物 2.0 μL (大约 1 mol/L), DNA 模板 2.0 μL (大约 50 ng), Taq 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 16.3 μL。PCR 反应程序为 Step 1 (预变性), 94℃, 240 s; Step 2 (变性), 94℃, 30 s; Step 3 (退火), 55℃, 30 s; Step 4 (延伸), 72℃, 30 s; 重复第二至第四步, 共 35 个循环; 72℃ 保温 10 min (结束)。扩增产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳分离加 EB 染色后, 在 BIO-RAD Quantity One 凝胶成像系统上观察。

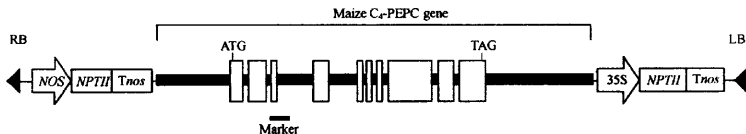


图 2 用于水稻转化的玉米 *pepc* 全基因及其抗性标记结构

Fig.2 Structure of intact maize *pepc* gene and the selective antibiotic resistance gene used for rice transformation

Marker 为采用玉米 C₄ 型 *pepc* 基因特异引物的扩增片段。

Marker was the fragment by amplifying the maize *pepc* gene-specific primer.

用 530 对 SSR 引物对两亲本转基因 Kitaake 和 881R 在整个水稻基因组上进行多态性分析, 微卫星

扩增方法参照文献[22]。结果显示有 103 对 SSR 引物表现多态性, 覆盖整个水稻基因组 (表 1), 其中在

第2染色体上的差异位点数最多,第12染色体上差异位点最少。利用鉴定出的103对差异SSR引物对6株携有玉米C₄型 *pepc* 基因、综合农艺性状较好的881P和轮回亲本881R进行遗传背景分析,以明确

它们之间的相似程度。相似程度 *F* 值计算公式为: $F = 2M_{11} / (M_1 + M_2)$ 式中 M_1 和 M_2 为两个个体分别具有的DNA片段数, M_{11} 为两个个体共同具有的DNA片段数

表1 蜀恢881和转玉米 *pepc* 基因水稻 Kitaake 间的SSR差异标记在染色体上的分布
Table 1 The difference SSR of Shuhui881 and transform Kitaake with maize *pepc* gene distributing on the chromosome of rice

染色体 Chromosome	差异标记 Difference SSR	差异位点数 No. of differential SSR
1	RM24, RM128, RM200, RM220, RM246, RM283, RM302, RM306, RM315	9
2	RM6, RM71, RM145, RM154, RM166, RM213, RM240, RM262, RM263, RM266, RM318, RM324, RM406, RM424, RM425	15
3	RM16, RM85, RM135, RM143, RM168, RM218, RM251, RM282, RM411, RM426	10
4	RM127, RM142, RM252, RM255, RM303, RM307, RM317, RM335, RM348	8
5	RM13, RM39, RM153, RM159, RM267, RM289, RM405, RM413, RM430	9
6	RM3, RM30, RM162, RM204, RM217, RM340, RM412	7
7	RM10, RM11, RM214, RM234, RM248, RM295, RM336, RM346, RM420, RM427	10
8	RM38, RM44, RM72, RM80, RM152, RM310, RM331, RM337, RM408	9
9	RM107, RM108, RM201, RM205, RM219, RM242, RM257, RM278, RM296, RM328	10
10	RM147, RM171, RM216, RM228, RM271, RM304	6
11	RM21, RM144, RM167, RM206, RM224, RM229, RM286	7
12	RM4, RM247	2

1.5 农艺性状考察及其数据处理

采用3×7不完全双列杂交设计,所有材料2005年4月15日播种于四川农业大学水稻研究所,在三叶期选择 *pepc* 基因特异引物PCR反应的阳性株移栽到大田,随机区组3个重复,规格行距0.27 m,窝距0.16 m,管理同大田。成熟时每小区除行间随机取样5株,考察株高、穗长、单株穗数、穗粒数、结实率、千粒重和单株产量。对农艺性状进行方差分析以及配合力计算,所有数据处理过程均在(Data Processing System, DPS)软件上进行。

2 结果与分析

2.1 目的基因检测与遗传背景分析

以玉米基因组为阳性对照,所有材料用玉米C₄型 *pepc* 基因特异引物进行扩增。所有携有 *pepc* 基因的杂交稻都能扩增出带型一致的311 bp片段(如图3,以1~15泳道为代表),与19泳道的玉米基因组的扩增结果一致,而相应的对照没有扩增出带,表明用 *pepc* 基因特异引物能够对含有玉米C₄型 *pepc* 基因的水稻植株进行准确的筛选。

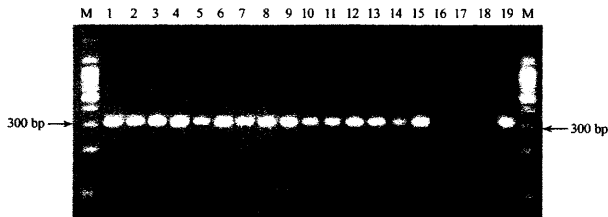


图3 含有玉米C₄型 *pepc* 基因杂交稻的PCR筛选

Fig.3 PCR analysis of hybrid rice with maize C₄-type *pepc* gene

1-15为含有玉米C₄型 *pepc* 基因杂交稻的植株,其中1-5泳道为G46A/881P; 6-10泳道为776A/881P; 11-15泳道为2480A/881P; 16、17和18泳道为CK1、CK2和CK3; 19泳道为玉米DNA; M为100 bp DNA maker.
Lanes 1-15: hybrid rice with maize C₄-type *pepc* gene; Lanes 1-5: G46A/881P; Lanes 6-10: 776A/881P; Lanes 11-15: 2480A/881P; Lanes 16-18: CK1, CK2, CK3; Lane 19: Maize DNA; M: 100 bp DNA maker.

表2显示的是6株881P与轮回亲本881R的背景筛选结果,相似程度 *F* 值在97.09%~99.03%之

间,其遗传背景和轮回亲本相当。说明通过杂交转育后,利用玉米C₄型 *pepc* 基因特异引物为基础建

立的分子标记辅助选择体系是有效的,能够将该基 因导入籼型水稻。

表 2 6 个改良蜀恢 881 单株的遗传背景分析结果

株号 Plant	差异位点数 No. of differential loci	差异标记 Differential SSR	差异位点在染色体上分布 Distribution of differential loci on chromosomes	F value (%)
Line 1	2	RM307, RM413	4,5	98.06
Line 2	3	RM71, RM307, RM413	2,4,5	97.09
Line 3	3	RM71, RM307, RM413	2,4,5	97.09
Line 4	2	RM71, RM307	2,4	98.06
Line 5	3	RM220, RM283, RM307	1,4	97.09
Line 6	1	RM307	4	99.03

2.2 含有 *pepc* 基因杂交稻及其对照的光合生理指标

表 3 中可以看出,3 个含有 *pepc* 基因 F₁ G46A/881P,776A/881P 和 2480A/881P 的表现量子效率都极显著高于对照,分别较各自对照提高了 30.6%、

54.3% 和 59.7%,光补偿点也相应提高了 29.8%、31.2% 和 36.9%,似乎表现出杂交稻导入 *pepc* 基因后更加“喜光”。比较光饱和点时的 P_n,3 个含有 *pepc* 基因的 F₁ 较对照提高了 11.7% ~ 12.4%。

表 3 含有 *pepc* 基因 F₁ 及对照的光合指标

Table 3 The Photosynthetic indexes of 3 F₁ with *pepc* gene and respective controls

材料 Material	PEPCase 活力 PA ($\mu\text{mol PEP} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$)	表观量子效率 AQY	光补偿点 LCP ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	光饱和点净 光合速率 LSP-P _n ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	羧化效率 CE	CO ₂ 补偿点 CCP ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)	CO ₂ 饱和点 净光合速率 CSP-P _n ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
G46A/881P	1134.42 ± 73.76**	0.052 ± 0.008**	36.70 ± 2.37**	28.0 ± 1.29**	0.094 ± 0.005**	40.68 ± 2.34**	27.4 ± 2.25*
G46A/881R	197.63 ± 19.85	0.040 ± 0.004	28.27 ± 1.87	24.9 ± 0.93	0.070 ± 0.008	58.62 ± 4.37*	24.0 ± 0.77
776A/881P	1210.17 ± 87.46**	0.071 ± 0.005**	30.06 ± 1.82**	28.6 ± 1.01**	0.104 ± 0.008**	41.51 ± 2.27**	30.5 ± 1.39*
776A/881R	185.01 ± 23.07	0.046 ± 0.003	22.92 ± 1.73	24.7 ± 0.82	0.075 ± 0.004	62.22 ± 4.75	26.5 ± 1.04
2480A/881P	865.39 ± 79.38**	0.075 ± 0.004**	26.19 ± 2.37**	29.5 ± 1.47*	0.110 ± 0.006**	45.05 ± 4.28**	29.1 ± 2.11*
2480A/881R	197.99 ± 29.34	0.047 ± 0.004	19.13 ± 1.32	26.4 ± 0.22	0.078 ± 0.010	58.83 ± 3.56	25.5 ± 1.12

注: * 达到 5% 显著水平; ** 达到 1% 显著水平,下同。Note: * significant at 5% level; ** significant at 1% level. The same below.

在羧化效率的比较中,G46A/881P、776A/881P 和 2480A/881P 分别比各自对照提高了 34.3%、38.7% 和 40.0%,CO₂ 补偿点相应地降低了 30.7%、33.3% 和 23.5%,显示出导入的 *pepc* 基因能提高对低浓度 CO₂ 的利用能力。进而测定 CO₂ 饱和点时的 P_n,3 个含有 *pepc* 基因的 F₁ 较对照提高了 14.1% ~ 15.1%。以上结果的根本原因可能在于含有 *pepc* 基因 F₁ 的 PEPCase 活力显著高于对照(表 3)。图 4 表明,PEPCase 活力与 P_n 极显著相关(0.6081**)。总之,导入的 *pepc* 基因对杂交稻光合特性的改善起到了重要的作用,奠定了水稻高产的生理基础。

2.3 含有 *pepc* 基因杂交稻及其对照的农艺性状表现

表 4 显示了农艺性状的考察结果,在株高的表现上,Line 1 ~ 6 与 3 个不育系的 F₁ 与各自对照的差异不大,只有个别组合出现了负向优势。6 个 881P 株系与 G46A 所配组合在穗长上显著或极显著高于对照,但其余 2 个不育系的 F₁ 与各自对照的差异不

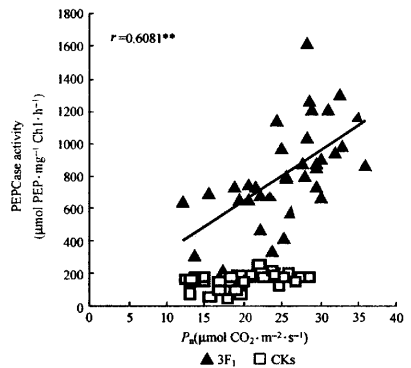


图 4 含有 *pepc* 基因 F₁ 及其对照 PEPCase 活性和净光合速率的相关性

Fig.4 The correlation between PEPCase activities and net photosynthetic rate(P_n) for 3 F₁ with *pepc* gene and their controls

大。在单株有效穗上,相对于对照而言,2480A/881P

各组合的竞争优势最明显, G46A/881P 次之, 而 776A 与 881P 所配组合相对于对照没有或为负竞争优势。除 G46A/Line 1 和 G46A/Line 6 外, F_1 在穗粒数上相对于对照的正向优势也不明显, 6 个 881P 株系与 2480A 所配 F_1 整体上呈负向优势。在结实率的表现上, 只有 776A 与 6 个 881P 株系所配组合的正向优势明显。千粒重作为一个重要指标, 直接关系到最终的产量, 6 个 881P 株系所配杂交稻的优势明显。6 个 881P 株系与 G46A 和 2480A 所配组合千粒

重的竞争优势分别达到了 4.92% ~ 14.44% 和 11.84% ~ 16.72%, 全部达到极显著水平, 776A/881P 中也有 3 个 F_1 的千粒重竞争优势在 8.06% ~ 14.2%。

在最后的单株生产能力上, G46A/881P 所有 F_1 极显著高于对照, 提高幅度达 26.31% ~ 65.95%; 2480A/881P 有 5 个 F_1 极显著高于对照, 提高幅度在 26.03% ~ 53.85%; 虽然 776A/881P 只有 2 个 F_1 高于对照, 但其中 776A/Line 6 在供试的材料中表现最高。

表 4 含有 *pepc* 基因杂交稻及其对照的农艺性状表现
Table 4 Performances on 7 agronomic traits of the hybrid rice with *pepc* gene and their controls

材料 Material	株高 Plant height (cm)	穗长 Panicle length (cm)	有效穗数 Tillers/plant	穗粒数 Grains/panicle	结实率 Seed setting (%)	千粒重 1000-grain weight (g)	单株重 Yield (g/plant)
G46A/Line 1	119.00 ± 2.02	26.57 ± 0.17**	8.22 ± 0.69**	242.35 ± 13.29**	0.7779 ± 0.0381	28.92 ± 0.85**	44.97 ± 4.38**
G46A/Line 2	115.33 ± 0.34*	25.60 ± 0.11*	7.45 ± 0.67	229.66 ± 11.32	0.7924 ± 0.0396	28.18 ± 1.42**	37.84 ± 2.71**
G46A/Line 3	121.11 ± 3.65	26.07 ± 0.21**	8.11 ± 0.64**	220.85 ± 14.39	0.7961 ± 0.0389	27.94 ± 0.91**	39.55 ± 4.34**
G46A/Line 4	118.89 ± 0.51	25.77 ± 1.15*	7.78 ± 0.22*	230.97 ± 14.66	0.8167 ± 0.0535	26.65 ± 0.89**	38.28 ± 3.09**
G46A/Line 5	121.78 ± 2.27	26.06 ± 0.93**	9.33 ± 0.57**	229.95 ± 11.16	0.7036 ± 0.0329	27.73 ± 0.56**	42.03 ± 4.88**
G46A/Line 6	122.22 ± 2.41	26.11 ± 0.53**	6.89 ± 0.39*	231.07 ± 4.82**	0.7930 ± 0.0242	27.13 ± 0.97**	34.23 ± 3.46**
G46A/881R	119.55 ± 2.04	24.38 ± 0.06	7.00 ± 0.26	211.40 ± 7.97	0.7479 ± 0.0391	23.92 ± 0.51	27.10 ± 2.22
776A/Line 1	118.11 ± 6.37*	27.44 ± 0.24	7.89 ± 1.26*	262.86 ± 13.77*	0.7268 ± 0.0714**	27.30 ± 0.77**	41.05 ± 4.20*
776A/Line 2	118.22 ± 3.00*	27.49 ± 1.47	8.00 ± 0.88*	272.07 ± 26.08	0.6752 ± 0.0521*	27.12 ± 0.86*	39.17 ± 4.13
776A/Line 3	116.78 ± 2.59*	27.58 ± 1.74	8.33 ± 1.85*	201.91 ± 18.32**	0.7631 ± 0.0798**	28.66 ± 0.67*	34.26 ± 3.48
776A/Line 4	120.11 ± 3.67	28.55 ± 1.35	8.44 ± 0.38	283.56 ± 19.03	0.6870 ± 0.0157*	26.42 ± 1.38	40.83 ± 4.40
776A/Line 5	119.78 ± 1.50	28.09 ± 1.33	9.44 ± 1.50	261.72 ± 26.91*	0.6237 ± 0.0248	26.56 ± 0.77	40.12 ± 3.53
776A/Line 6	123.44 ± 1.83	27.74 ± 0.79	10.33 ± 1.52	271.81 ± 14.22	0.6900 ± 0.0789*	26.35 ± 1.13	50.50 ± 7.01**
776A/881R	126.56 ± 0.20	27.38 ± 0.20	10.00 ± 1.46	296.42 ± 28.64	0.5885 ± 0.0337	25.10 ± 0.94	37.49 ± 3.92
2480A/Line 1	119.56 ± 1.02	26.52 ± 0.69	7.78 ± 0.84**	222.36 ± 21.79**	0.8166 ± 0.0225	26.32 ± 0.64**	37.50 ± 3.55**
2480A/Line 2	115.33 ± 2.40	26.17 ± 0.60	8.00 ± 1.08**	225.00 ± 24.35*	0.7596 ± 0.0173	27.37 ± 0.17**	36.30 ± 3.06**
2480A/Line 3	115.89 ± 3.34	26.54 ± 0.48	8.33 ± 0.34*	226.09 ± 10.43**	0.7785 ± 0.0134	26.01 ± 0.49**	38.57 ± 2.95**
2480A/Line 4	116.67 ± 3.28	26.52 ± 1.05	6.89 ± 0.34*	261.30 ± 15.80	0.7846 ± 0.0440	27.14 ± 1.11**	34.55 ± 4.67**
2480A/Line 5	116.67 ± 3.18	26.18 ± 0.99	7.22 ± 0.19**	221.67 ± 16.14**	0.7635 ± 0.0115	26.46 ± 0.14**	31.60 ± 3.71*
2480A/Line 6	113.56 ± 3.18*	26.46 ± 0.23	8.11 ± 1.07**	217.73 ± 7.91**	0.8141 ± 0.0426	26.04 ± 0.23**	37.68 ± 2.66**
2480A/881R	121.45 ± 1.95	27.83 ± 0.98	5.00 ± 0.67	273.33 ± 18.53	0.7936 ± 0.0722	23.26 ± 1.25	25.07 ± 2.10

2.4 一般配合力 (GCA) 以及特殊配合力 (SCA) 相对效应分析

在不育系 GCA 效应分析中 (表 5), 776A 的表现良好, 除了在结实率和千粒重 2 个性状上的 GCA 较另外 2 个不育系低外, 其余性状的 GCA 都是最高的, 特别在单株穗数、穗粒数和单株产量 3 个性状的比较中优势明显。

对于 6 个 881P 以及 881R, 它们的 GCA 在不同的性状间表现各不相同。在株高、穗长、单株穗数、穗粒数、结实率和千粒重的考察中, 表现最好的分别是 881R、Line 4、Line 5、881R、Line 3 和 Line 2。Line 1 单株产量的 GCA 最高, 其次是 Line 6, 它与 Line 1 的

差异不大。至此, 对于不同的改良 881P 株系, 可以从供试的材料中鉴定出 Line 1 和 Line 6, 作为今后进一步考察利用的参考。

从表 5 中可以看出, 同一组合不同性状之间以及不同 F_1 的同一性状之间的 SCA 表现差异明显。另外, F_1 的 SCA 效应与亲本的 GCA 效应并不一定对应。以单株产量为例, 2480A 和 Line 3 的 GCA 效应较低, 但 2480A/Line 3 的 SCA 效应表现较好; 776A 的 GCA 效应较高, 但除了 776A/Line 6 和 776A/881R 外, 其他 F_1 的 SCA 效应表现都很差。从中可以看出, SCA 效应较高的 F_1 , 它的亲本中一定有一个 GCA 效应较高, 但结合表 4 的数据可以得出, 只有双

亲 GCA 都较高的 F_1 才能在某一个性状上表现较好, 很有希望成为组合推广。理想, 才可能是真正的高产组合, 所以 776A/Line 6

表 5 7 个农艺性状一般配合力和特殊配合力的相对效应值
Table 5 The relative value of general combining ability and specific combining ability of 7 agronomic traits

		SCA						881R	GCA
		Line 1	Line 2	Line 3	Line 4	Line 5	Line 6		
株高 Plant height	G46A	-0.4528	-1.3544	2.1279	-0.2671	1.4447	1.5389	-3.0372	0.5461
	776A	-1.8140	0.4568	-2.1229	0.1469	-0.8489	1.9501	2.2320	1.1597
	2480A	2.2668	0.8976	-0.0049	0.1201	-0.5957	-3.4891	0.8052	-1.7059
	GCA	-0.1332	-2.3116	-0.9415	-0.4141	0.3017	0.5827	2.9160	
穗长 Panicle length	G46A	2.4371	0.3743	0.9857	-0.9566	0.7736	0.9774	-4.5915	-3.4477
	776A	-1.6517	0.1283	-0.6951	2.1163	1.0391	-0.2418	-0.6951	3.8726
	2480A	-0.7854	-0.5026	-0.2905	-1.1597	-1.8127	-0.7355	5.2866	-0.4248
	GCA	0.4753	-1.1051	0.0553	0.8621	0.2175	0.2008	-0.7058	
有效穗数 Tillers/plant	G46A	5.7394	-2.0826	0.6447	3.4274	10.7925	-16.8681	-1.6534	-2.4999
	776A	-12.0958	-8.8286	-10.2130	-1.9065	-1.4358	12.3944	22.0853	11.1406
	2480A	6.3564	10.9111	9.5683	-1.5209	-9.3566	4.4736	-20.4319	-8.6407
	GCA	-0.7792	-2.6343	2.9033	-4.0326	7.9564	5.2153	-8.6288	
穗粒数 Grains/panicle	G46A	5.9211	0.8070	7.8778	-5.4019	2.7669	2.2278	-14.1987	-5.9934
	776A	-0.5875	3.3252	-14.8964	1.3171	0.8975	4.0603	5.8838	8.9702
	2480A	-5.3336	-4.1321	7.0186	4.0848	-3.6645	-6.2882	8.3149	-2.9768
	GCA	-0.0219	-0.1364	-10.8391	6.6098	-1.9768	-0.9773	7.3417	
结实率 Seed setting rate (%)	G46A	-3.2090	2.9275	-1.5020	3.4614	-2.8715	-0.1102	1.3038	3.7621
	776A	2.8277	0.1185	6.9480	-1.0338	-0.6889	-1.0190	-7.1525	-9.1085
	2480A	0.3813	-3.0461	-5.4460	-2.4275	3.5603	1.1292	5.8487	5.3464
	GCA	3.5480	-0.6481	4.2766	2.0745	-6.7326	2.4655	-4.9840	
千粒重 1000-grain weight (g)	G46A	3.3388	0.4085	-0.4323	-2.2429	1.1078	0.4043	-2.5842	1.9266
	776A	-1.1494	-1.9819	3.8704	-1.5490	-1.6822	-0.9246	3.4167	0.3461
	2480A	-2.1894	1.5734	-3.4381	3.7919	0.5744	0.5203	-0.8325	-2.2727
	GCA	3.0599	3.2431	3.1598	0.1629	0.8331	-0.7112	-9.7476	
单株重 Yield (g/plant)	G46A	9.6957	-0.2485	5.1431	0.6358	10.5365	-17.9146	-7.8480	0.4180
	776A	-8.1477	-4.0738	-16.3285	0.0332	-1.9301	18.0090	12.4379	7.8077
	2480A	-1.5480	4.3223	11.1854	-0.6690	-8.6064	-0.0945	-4.5899	-8.2257
	GCA	9.6303	0.5719	-0.2594	0.8796	0.9604	8.6427	-20.4255	

3 讨论

作物物质生产的主要来源是光合作用, 20 世纪 60 年代, 以矮化育种为标志的“绿色革命”减小了群体的消光系数, 从而提高了群体截光率和光能利用率, 使水稻等作物的产量大幅提高; 而 20 世纪 70 年代在理想株型基础上的杂种优势利用, 增大了群体的最适叶面积指数以及群体光合能力, 使产量得到进一步提升, 可见作物在产量上的每一次飞跃无不伴随着光合作用的改善。如能进一步提高单叶的光合能力将是实现“超级稻”育种计划的一条有效途径^[21], 而运用现代生物技术手段把 C_4 途径的光合基因导入 C_3 作物, 以提高它们的 C_4 特性是这方面有益的尝试。在进化的过程中, C_4 植物形成了与其光合循环相匹配的 Kranz 解剖结构。但可以明确的

是, C_4 植物光合作用的关键并不在于它的 Kranz 解剖结构, 而是控制其 C_4 途径的酶系统^[5]; 近年在无 Kranz 解剖结构的水生植物 *Hydrilla verticillate* 和 *Egeria densa* 中发现有 C_4 光合途径的运行^[24], 预示着通过 C_4 光合酶基因向 C_3 植物的转移提高 C_3 植物光合作用的可行性。

Ku 等利用农杆菌介导系统成功地将玉米光合作用 C_4 途径的关键酶基因 *pepc* 导入水稻, 转基因种质是否具有 C_4 作物玉米的高光效与 CO_2 浓缩机制倍受关注。越来越多的研究结果已证实了高表达的转 *pepc* 基因水稻具有高光效特性, 而且它的耐光氧化能力也有所加强^[14], 含有 *pepc* 基因水稻在农艺性状及其最终产量表现优于不含有 *pepc* 基因对照的报道也有不少^[16-17, 25]。本试验再次显示了通过杂交

转育的方法可以将 *pepc* 基因所具备的 C_4 特性进行传递,并且通过配组,在新的遗传背景中 *pepc* 基因同样实现了高表达, G46A/881P、776A/881P、2480A/881P 的 PEPCase 活力相对于对照分别提高了 5.74 倍、6.54 倍和 4.73 倍,各项光合指标也优于相对应照。良好的光合表现奠定高产坚实的生理基础,在千粒重等农艺性状的表现上,含有 *pepc* 基因的 F_1 与对照相比有不同程度的增加,最终也反映到单株产量上。

我们研究的创新之处在于以当前广泛使用的籼型恢复系为基因受体,通过 BLAST 设计 *pepc* 基因自身的特异引物进行 MAS,并且结合田间农艺性状与光合生理表现,自行建立了一套行之有效的 MAS 筛选体系,并用 6 个与蜀恢 881 遗传背景相似度在 97.09% ~ 99.03% 的 881P 株系与不育系配组,较李霞、王德正等^[15-17] 研究转基因原种 Kitaake 与不同的不育系或恢复系直接杂交所获 F_1 更具实际意义和组合推广价值。结合 3×7 的不完全双列杂交进行产量配合力分析,鉴定出 *GCA* 表现较好的是 Line 1 和 Line 6; 在 *SCA* 的考察中, G46A/Line 1、G46A/Line 5、776A/Line 6 和 2480A/Line 3 的表现较好;特别是 776A/Line 6 的单株生产能力在所有的 F_1 中表现最好, Line 6 的 *GCA* 和 *SCA* 也非常理想,是进一步考察的重点。以上的试验结果对我们的育种实践具有直接的指导意义,在今后的工作中,应进一步对 *GCA* 和 *SCA* 高的株系进行考察,将 MAS 选育的含玉米 *pepc* 的优良恢复系尽快应用于大田。

4 结论

本实验以单叶光合能力为研究切入点,运用现代生物技术结合传统杂交育种方法,将 C_4 植物 C_4 途径关键酶基因 *pepc* 导入 C_3 植物水稻, C_4 途径关键酶基因 *pepc* 在水稻叶片中的高表达增强了其 C_4 光合循环的运行,再次显示了通过提高相应酶活力水平增强 C_3 植物叶片 C_4 特性的可行性。单叶光合能力的增强是群体光合效率改善的基础,通过分子标记辅助选育培育的含 *pepc* 基因杂交稻在单株生产能力方面的优势也是单叶光合特性改善的印证。本试验无疑对于现今在理想株型基础上的杂种优势利用及其实现“超级稻”育种计划的终期目标提供有益的参考。

References

- [1] Yu S-W(余叔文). The Plant Physiology and Molecular Biology(植物生理学与分子生物学). Beijing: Science Press, 1992. pp 236-243 (in chinese)
- [2] Menz K M, Moss D M, Cannell R Q, Brun W A. Screening for photosynthetic efficiency. *Crop Sci.* 1969, 9: 692-694
- [3] Bjorkman O, Nohs M, Berry J A. Further studies on hybrids between C_3 and C_4 species of *Atriplex*. *Carnegie Inst Washington Yearb.* 1971, 70: 507-511
- [4] Brown R H, Bouton J H. Physiology and genetics of interspecific hybrids between photosynthetic types. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1993, 44: 435-456
- [5] Teng S(滕胜), Qian Q(钱前), Huang D-N(黄大年). Advance in molecular biology and genetic engineering of C_4 photosynthesis pathway. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2001, 9(2): 198-201 (in Chinese with English abstract)
- [6] Ku M S B, Agrie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M. High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotech.* 1999, 17: 76-80
- [7] Tsuchida H, Tamai T, Fukayama H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Nishizawa Y, Lee B H, Hirose S, Toki S, Ku M S B. High level expression of C_4 -specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth of a C_3 plant, rice. *Plant Cell Physiol.* 2001, 42: 138-145
- [8] Fukayama H, Tsuchida H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Lee B H, Hirose S, Toki S, Ku M S B, Makino A, Matsuoka M, Miyao M. Significant accumulation of C_4 -specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C_3 plant, rice. *Plant Physiol.* 2001, 127: 1136-1146
- [9] Gehlen J, Panstruga R, Smets H, Merkelbach S, Kleines M, Porsch P, Fladung M, Becker I, Rademacher T, Hütsler R E, Hirsch H J. Effects of altered phosphoenolpyruvate carboxylase activities on transgenic C_3 plant *Solanum tuberosum*. *Plant Mol Biol.* 1996, 32: 831-848
- [10] Ishimaru K, Ohkawa Y, Ishige T, Tobias D J, Ohsugi R. Elevated pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C_3 transgenic potatoes with a C_4 maize PPDK gene. *Physiologia Plantarum.* 1998, 103: 340-346
- [11] Matsuoka M, Furbank R, Fukayama H, Miyao M. Molecular engineering of C_4 photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001, 52: 297-314
- [12] Ishimaru K, Ichikawa H, Matsuoka M, Ohsugi R. Analysis of a C_4 maize pyruvate, orthophosphate dikinase expressed in C_3 transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Sci.* 1997, 129: 57-64
- [13] Chen L-M, Izui K. Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from a Thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus*: unusual allosteric properties and its gene expression in *Arabidopsis thaliana*. In:

- Proceedings of 12th International Congress on Photosynthesis. Canberra, Australia: CSIRO Publishing, 2002, S17-21
- [14] Li X(李霞), Jiao D-M(焦德茂). Transgenic rice overexpressing C_4 photosynthetic genes and their application in breeding. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2005, 3(4): 550-556 (in Chinese with English abstract)
- [15] Li X(李霞), Jiao D-M(焦德茂), Dai C-C(戴传超), Wang S-H(王守海), Wu S(吴爽), Li C-Q(李成荃). Photosynthetic characteristics for rice hybrid with transgenic PEPC parent HPTER-01. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2001, 27(2): 137-143 (in Chinese with English abstract)
- [16] Wang D-Z(王德正), Jiao D-M(焦德茂), Wu S(吴爽), Li X(李霞), Li L(李莉), Chi W(迟伟), Wang S-H(王守海), Li C-Q(李成荃), Luo Y-C(罗彦长), Wang X-F(汪秀峰). Breeding for parents of hybrid rice with maize PEPC gene. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2002, 35(10): 1165-1170 (in Chinese with English abstract)
- [17] Wang D-Z(王德正), Chi W(迟伟), Wang S-H(王守海), Jiao D-M(焦德茂), Wu S(吴爽), Li X(李霞), Li C-Q(李成荃), Zhang Y-H(张云华), Luo Y-C(罗彦长). Characteristics of transgenic rice overexpressing maize photosynthetic enzymes for breeding two-line hybrid rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(3): 248-252 (in Chinese with English abstract)
- [18] He L-B(何立斌), Xiang X-C(向琀朝), Li J-H(李季航), Zhong L(钟黎), Zhang K-Z(张楷正), Li P(李平). Analysis on genetic background and photosynthetic characteristics of the improved Shuhui 881 with maize C_4 -type *pepc* gene. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2006, 20(1): 31-35 (in Chinese with English abstract)
- [19] Kung S D, Chollet R, Marsho T V. Crystallization and assay procedures of tobacco ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Method Enzymol*, 1980, 69: 326-335
- [20] Gonzalez D H, Iglesias A A, Andreo C S. On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate: Effect of PH. *Plant Physiol*, 1984, 116: 425-430
- [21] Wang Z(王珍), Fang X-J(方宣钧). Methods in lab of molecular plant breeding(1)-plant DNA isolation. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2003, 1(2): 281-288 (in Chinese with English abstract)
- [22] Kangle G S, Ning Huang, John B, Gurdev S K. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. IRRRI Discussion Paper Series, No. 12. 1995. pp 1-24
- [23] Horton P, Murchie E H. C_4 photosynthesis in rice: some lessons from studies of C_3 photosynthesis in field-grown rice. In: Sheehy J E, Mitchell P L, Hardy B eds. Redesigning Rice Photosynthesis to Increase Yield. IRRRI, 2000. pp 127-144
- [24] Magnin N C, Cooley B A, Reiskind J B, Bowes G. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranzless, C_4 -type photosynthesis in *Hydrilla verticillate*. *Plant Physiol*, 1997, 115(4): 1681-1689
- [25] Jiao D M, Huang X Q, Li X, Chi W, Kuang T Y, Zhang Q-D, Ku S B M, Chao D G. Photosynthetic characteristics and tolerance to photo-oxidation of transgenic rice expressing C_4 photosynthesis enzymes. *Photosynthesis Res*, 2002, 72: 85-93