

雄不稔性水稻稔性恢復基因之尋求 與提高天然雜交率之研究

卜瑞雄 黃眞生

Searching for the Fertility Restorer and
to Increase the Outcrossing Rate of Hybrid Rice

Ra-Hsiung Buu & Chen-Seng Huang

摘 要

爲進一步提高水稻的生產潛力，雜種品種之育成是一具有吸引力的途徑。水稻乃自交作物，如欲利用 F_1 雜種優勢，必須具有穩定的細胞質雄不稔系統 (CMS line)，維持親 (Maintainer)，優良的稔性恢復系統 (Rf line)，以及具有高天然雜交率。研究結果如下：

(一) 稔性恢復基因後裔檢定結果，對 *O. rufipogon* 細胞質雄不稔 Reimei 及對 CBII 細胞質雄不稔 IGG、16-3 的稔性恢復基因可能爲多對，且易受環境因子影響，而對 WA 型細胞質雄不稔系 Chen-shan 97 已找到 25 個品種 (系) 具有其稔性恢復基因，其中有些 F_1 顯示有很高之產量優勢，可利用於生產雜種種子。

(二) 以 DPX-3778 1000~3000 ppm 噴施 CMS-A 系統能顯著延長 Chen-shan 97 A 或 Reimei A 之一天的開穎時間，而 GA_3 及 IAA 則無此效果；殺草劑 2,4-D 及 Saturn 亦有促進 CMS-A 及 B 系統提早開穎時間之作用，此能否利用於雜種種子生產上，以助於天然雜交率之提高，猶待進一步之研究。

(三) CMS-A 系統與 B 系統種植行數不同比例對 A 系統種子之生產似無多大差異，故爲了使雜種種子的生產愈經濟，採行 A : B 系統種植行數 5 : 1 者較 1 : 1 者爲佳。

(四) CMS-A 系統若放任田間與其他水稻品種一同種植時，約有 20 % 之花粉污染，須將 CMS-A、B 系統或 CMS-A 與 Rf 系統種於隔離田區內，始能保持 CMS-A 系統及 F_1 種子之純度。

(1) 本研究蒙農發會補助試驗經費 (71 農建 - 2.1 - 產 - 30 (3))，謹此致謝。

(2) 蘭陽分場副研究員、農試所研究員。

一、前 言

爲進一步提高水稻的產量潛力，採用雜種品種以利用其 F_1 雜種優勢爲一有效新途徑；目前應用雜種品種於商業生產的作物有洋葱、黍蜀、甜菜、番茄、玉黍蜀及向日葵等作物^(5,7)，因此，爲提供水稻增產新途徑，探討雜種水稻育種之可行性，是一極具研究價值之課題。

水稻雜種種子之生產，必須要有穩定之細胞質雄不稔系統 (Cytoplasmic male sterility line ; CMS line) 外，還須有優良之稔性恢復系統 (Restoring fertility line ; Rf line)，以及繁殖雄不稔系統用之維持親 (Maintainer)。細胞質雄不稔性及稔性恢復基因已證實存在於栽培稻內^(6,8,11,13)，然有些不稔性與稔性恢復系統常受環境因子，如溫度、季節等所影響而表現不穩定^(4,9)，影響將來雜交種子之生產以及雜交種子之產量，因此必須尋求多數不同來源之細胞質，以便篩選更適合的細胞質雄不稔性系統及稔性恢復系統，本研究乃繼過去已育成及引進多數之 CMS 品系 (種)，除了繼續保存不稔系統外，同時將不同雄不稔性細胞質轉移至實用品種，並圖以後裔檢定交配 (Test cross) 繼續選出具有稔性恢復基因 (Rf gene) 之品種 (系)，然後測驗各雜種品種 (系) 的產量，以及雜種優勢之程度，以供水稻雜種種子之生產。

爲了使雜種種子的生產符合經濟條件，除有賴於 CMS 和 Rf 基因之利用外，還須注意如何在雄不稔的植株上得到更多的異花授粉種子，因爲水稻爲自交作物，一般雜交率很低，各種不同水稻 CMS 系統的天然雜交率亦不超過 30%^(2,3)，故欲提高水稻的天然雜交率，勢必改造花器構造，以利雜交率之提高，此可由許多途徑加以解決，如延長柱頭接受外來花粉之時間，亦即延長小穗花開穎時間；或尋求柱頭於開花閉穎後尚露出穎外之基因，並導入於 CMS 系統；以及提高每株之花粉量及花粉散播程度等，皆可提高雜交率^(10,12)，雜交成功率越大，花粉親對雄不稔系統之種植比例可減少，則雜交種子的生產愈經濟。因此，如何使 CMS line 與 Maintainer 或 CMS line 與 Rf line 之開穎及開花能同步化，以及如何以栽培法或其他方法提高雜種水稻之天然雜交率，爲今後應繼續努力目標之一。

本試驗之研究目的，除了繼續以後裔檢定交配，尋求有效而雜種優勢大之稔性恢復品系 (種) 外，並施用生長素及化學藥劑來探討 CMS 系統與 Maintainer 及 CMS 與 Rf 系統間開花習性，期能使其開穎同步化，增加天然雜交率，使雜種種子的生產符合經濟條件。

二、材料與方法

材料：水稻細胞質雄不稔（CMS）Chen-shan 97 A（WA），Reimei A（*O. rufipogon*），IGG A（Boro）及16-3 A（Boro）等4品種（系）。稔性恢復（Rf）檢交用父本144品種（系），包括IR 5032、泰國種有關之F₄及F₅系統、IR品種（系）等。DPX-3778、GA₃（Gibberellic acid）及IAA（Indole acetic acid）3種生長素與2,4-D，Stam F-34，Saturn及Basagran等4種殺草劑。

方法：在田間分批繁殖檢交用父本，將4個CMS-A系統與14父本分別雜交，後繁殖F₁，由後裔檢定鑑別是否具有稔性恢復基因存在。並以不同株數或行數比率種植CMS-A及B系統，後調查A系統之結實率及種子生產量。同時在玻璃室於抽穗前後以不同濃度之生長素或殺草劑噴施CMS-A、B系統，然後調查其開穎時間及開穎時間長短等。

三、結 果

細胞質雄不稔性（CMS）稔性恢復（Rf）系統之檢交結果如表一，對Reimei A（*O. rufipogon*）之不稔性並無Rf品系（種）出現，所測試父本品系（種）多數來自IR 5032雜交組合之後代系統，IR 5032為已測有Rf基因之品系⁽¹⁾，然其雜交後代却無Rf系統之分離；具*O. rufipogon*親緣之新品系也無Rf基因出現，可能籼粳兩型稻之間的遺傳隔離，使Rf基因無法重現，Reimei A（*O. rufipogon*）的細胞質來自*O. rufipogon*，其不稔性可能要有作用較強之Rf基因方能恢復，對IGG A（Boro）及16-3 A（Boro）的檢交結果，有一點相似，其F₁結實率呈連續性分佈（表1），而其細胞質亦均來自Chinsurah Boro II。至於Chen-shan 97 A（WA）有相當理想之結果，已找出25個品種（系）具有Chen-shan 97 A（WA）稔性恢復基因，其中有些F₁具有很高之產量潛力，擬大量生產其雜交種子，參加高級產量比較試驗。

表一、CMS 稔性恢復系統檢交 F₁ 結實率之分佈

雜 交 親 本		F ₁ 結 實 率 (%)										
♀	♂	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95	
Reimei A (<i>O. ruf.</i>)	具 <i>O. rufipogon</i> 親緣新品系	17										
	IR 5032 有關之系統	22	11	2								
	其 他	5										
IGG A (Boro)	IR 5032 有關之系統			2	2	5	3	6	12	8		
16-3A (Boro)	IR 5032 有關之系統			2	5	4	6	13	5	1		
	其 他	1										
Chen-shan 97A (WA)	具 <i>O. rufipogon</i> 親緣新品系	4										
	IR 5032 有關之系統	4	8	8	8	8	10	3	11	2	1	
	其 他 ^{1/} 1971-II	1	1					3		1		
		27	11	3	3	6	2	5	12	4	8	

^{1/} 1971年第二期作試驗結果，主要係由 IRR1 引進者，其餘均為 1971 年第一期作試驗結果。

以不同的 A、B 系統之種植行數比率測驗 A 系統之結實率，結果如表二所示，Chen-shan 97 A (WA) 之天然雜交率有 22.0~26.4%，經後裔檢驗證明，其中有 10~20% 是來自花粉污染的天然雜交，而非與 Chen-shan 97 B 之外雜交者。此乃因 A、B 系統未與其他品種隔離，以致花粉嚴重污染。Reimei A (*O. rufipogon*) 及 16-3 A (Boro) 的天然雜交率則甚低。CMS-A 系統套袋後尚有 1~2% 之結實率，可能由於套袋後紙袋被風吹破或套袋前已授粉之關係。一般言之，增加 B 系統之行數，並無法顯著提高 A 系統之結實率，因此若採用 A 系統與 B 系統種植行數比為 4:1 者，似乎較為經濟。

表二、CMS - A , B 系統種植株數不同比率與A 系統結實率之關係

種植比率 A:B	Chen-shan 97A(WA)		Reimei A(<i>O. ruf.</i>)		16-3 A (Boro)	
	套袋	未套袋	套袋	未套袋	套袋	未套袋
1:1	0.49	22.0	0.15	7.0	2.3	8.0
2:1	0.51	24.4	0.57	4.7	1.5	7.8
4:1	1.80	26.4	0	5.3	1.6	7.9

另以 1 : 1、2 : 1、3 : 1 及 5 : 1 之 A : B 系統種植行數比率來測驗 CMS 品種之種子生產，結果示如表三，A : B 系統種植行數不同比率間對 A 系統種子之生產似乎並無多大差異，故在操作及經濟利益上，採用 5 : 1 之 A : B 系統種植行數比率似較合算，本期作因恐花粉污染，特延後移植，結果至 12 月底才完成收穫，因抽穗前遇低溫，開花期延遲，故除 IGG A (Boro) 之種子生產量估計達 1000 Kg / ha 以上，其他品種 (系) 種子量甚少。

表三、CMS 品種的 A , B 系統不同行數種植時之種子產量 (g / 10m²)

A:B	Chen-shan	16-3 A	34-60 A	IGG A
種植行數比	97 A (WA)	(Boro)	(Boro)	(Boro)
1:1	94	100	29	1128
2:1	135	150	29	857
3:1	67	203	20	943
5:1	91	115	25	1355

除了上述田間試驗外，並在溫室內以生長素 DPX-3778、GA₃ 及 IAA 不同濃度處理雄不稔系統，結果示於表四。DPX-3778 以 1000~3000 ppm 噴施時，能顯著延長 Chen-shan 97 A 或 Reimei A 之開穎時間，有的甚至長達 7~8 小時，若此等 A 系統比 B 系統早開穎，則 DPX 之噴施將有助於天然雜交率之提高，其他使用之藥品 GA₃ 及 IAA 等則效果不顯著。另外，試以幾種殺草劑噴施 CMS-A 及 B 系統之結果，似有促進提早開穎時間之作用（表五），尤以 Saturn 及 2,4-D 對 A 系統更為顯著，此結果之正確效果尚待進一步的試驗。

表四、生長素對 CMS 系統開穎之影響（民國 70 年 12 月）

A. Chen-shan 97 A (WA)

生長調節劑		抽穗前一週噴施		抽穗期噴施		抽穗後一週噴施	
		穎花開穎		穎花開穎		穎花開穎	
種類	濃度	始 (a.m.)	平均小時	始 (a.m.)	平均小時	始 (a.m.)	平均小時
		DPX	0 (ppm)	9:50	3.5	8:30	4.1
200	8:50		5.4	8:30	3.7	8:30	4.0
500	8:50		4.4	8:30	3.8	8:30	4.4
1000	8:50		6.1	8:30	3.5	8:30	3.1
2000	9:00		5.6	8:30	6.2	8:30	5.1
3000	9:20		7.1	8:30	8.8	8:30	8.2
GA ₃	0 (M)	8:30	5.5	8:30	3.4	8:30	5.6
	10 ⁻⁷	8:30	5.7	8:30	3.2	8:30	5.1
	10 ⁻⁶	8:30	5.4	8:30	4.7	8:30	4.2
	10 ⁻⁵	8:30	5.3	8:30	2.8	10:30	3.7
	10 ⁻⁴	8:30	5.1	8:30	3.2	11:30	3.1
	10 ⁻³	8:30	5.1	8:30	3.5	8:30	6.3

B. Reimei A (*O.ruf.*)

生長調節劑		抽穗前一週噴施		抽穗期噴施		抽穗後一週噴施	
種類	濃度	穎花開穎		穎花開穎		穎花開穎	
		始 (a.m)	平均小時	始 (a.m)	平均小時	始 (a.m)	平均小時
DPX	0 (ppm)	8:30	2.7	10:30	1.8	8:30	2.9
	200	8:30	2.3	9:30	1.8	8:30	2.5
	500	8:30	2.1	8:30	2.2	10:30	2.5
	1000	8:30	5.8	8:30	6.5	8:30	7.9
	2000	9:30	9.2	8:30	7.3	8:30	6.8
	3000	8:30	10.5	8:30	8.9	8:30	8.1
	GA ₃	0 ⁻⁷ (M)	9:30	2.2	9:30	1.8	9:30
10 ⁻⁶		9:30	2.0	9:30	2.5	8:30	4.2
10 ⁻⁵		10:30	1.9	8:30	2.1	8:30	3.3
10 ⁻⁴		9:30	2.1	8:30	3.4	8:30	2.2
10 ⁻³		8:30	1.9	8:30	4.2	9:30	5.3
		10:30	2.1	8:30	2.7	8:30	2.8

表五、各種殺草劑對Chen-shan 97 (WA) A, B系統開穎時間之影響 (7/XII 氣溫較低, 8/XII 氣溫回升)

殺草劑		Chen-shan 97 A ^{2/}		Chen-shan 97 B ^{3/}	
種類	濃度	7/XII	8/XII	7/XII	8/XII
Basagran	1/200	3.8 ^{1/}	7.4	7.7	8.0
Basagran	1/100	2.9	7.8	7.8	7.5
Saturn	1/200	3.4	5.3	7.7	8.8
Saturn	1/100	4.9	6.1	7.9	7.2
Stam F-34	1/200	2.5	5.0	7.7	7.1
Stam F-34	1/100	4.8	6.8	7.4	7.3
2,4 - D	1/300	2.2	3.5	7.0	7.5
2,4 - D	1/100	3.5	5.8	7.0	-
C K	0	5.3	7.6	8.3	7.4

1) 表中數字以7:00 a.m. 爲0, 單位小時。

2) 主桿穗較多。

3) 因早抽穗, 故主桿較少。

四、討 論

本研究除繼續保存過去已育成之多數不稔系統外，繼續以世代促進方法 (Rapid Generation Advance) 之回交育種育成現行優良栽培種之雄不稔系統。同時不斷在現行栽培品系 (種) 中以及保存之 germ-plasm 中尋求稔性恢復系統，期能馬上利用於雜種種子之生產。由過去所做 Rf 檢交結果中，雖亦找到一些能恢復 Chen-shan 97 A 雄不稔性之品種 (系)，但對於硬型稻雄不稔性，尚未找到理想之 Rf 系統。因此，除了更廣泛的大量做 Rf 檢交，繼續找尋 Rf 系統外，更以回交育種將 Rf gene 移入硬稻品種，育成硬稻之 Rf 系統，然後測驗各雜種品系之產量以及雜種優勢之程度，期能育成優良而突出之雜種品種。

水稻為自交作物，天然雜交率甚低，利用雄不稔系統後其天然雜交率若不能大幅度提高，則生產雜種種子之成本將相對提高，故如何提高天然雜交率以及如何大量經濟繁殖雄不稔系種子，為雜種種子生產重要之一環。雜種水稻已接近實用階段，目前對於如何提高天然雜交率仍須進一步研究。本試驗發現雄不稔系統與維持系統之抽穗期不甚一致，一般 A 系統 (不稔系) 較 B 系統 (維持系) 晚抽穗約 2~3 天，此或許由於 A 系統種子來自回交，經剪穎後授粉及播種時先剝殼，以致影響其生育而與正常之 B 系統抽穗期稍不一致。此須進一步由其開花習性及花器構造上尋求答案，故將來有必要將 B 系統分兩次不同時期播種，以確保花粉源，提高 CMS 之天然雜交率。

雄不稔性 A、B 系統之每天開穎時間未能同步化亦是影響天然雜交率之因素之一。本試驗以 Chen-shan 97 為例，A 系統常於上午 8~11 時開花，而 B 系統却比 A 系統晚開穎約 3 個小時 (表四、五)。因此在不同環境下澈底調查各種 CMS 品種 (系) 之 A、B 系統每天的開穎時間實有必要，以便設法使 A、B 系統之開穎時間一致。噴施 DPX 雖有延長開穎時間，施用殺草劑亦有提早開穎之作用，但這些化學藥劑之施用是否亦會影響其授粉能力，亦須更進一步之探討。

由本實驗觀之，目前已明瞭一些化學藥劑或生長素或可以繼續研究 A、B 系統同步化之問題，將來也許有助於天然雜交率之提高。為達到 A、B 系統或 A 與 Rf 系統開花同步化，亦可採用剪葉法，抽穗前將劍葉剪除，以減少授粉之阻碍，或以大型動力吹風機，於開花盛期，每天吹風 2~3 次，以增加花粉之傳播。

雄不稔系統若放任田區與一般水稻品種同種植時，證明其後裔約有 20% 是來自花粉污染，因此，為避免花粉之污染，必須將 A、B 系統或 A 與 Rf 系統種植於隔離田區內，始能保持花粉不稔系統及 F₁ 雜種品系種子之純度。

五、參考文獻

1. 成游貴, 1981, 水稻細胞質一基因雄不稔性之研究, 國立台灣大學博士論文。
2. 林明華, 1971, 雜種水稻雜交種子之生產方法試驗, 稻作改良年報(六十八年) P. 179 ~ 181。
3. Carnahan, H.L., J.R. Erickson, S.T. Tseng and J.N. Rutger. 1972. Outlook for hybrid rice in the U.S.A. Rice Breeding. IRRI. p. 603-607.
4. Cheng, Y.K. and C.S. Huang. 1979. Some properties of cytoplasmic male sterile rice. J. Agri. Res. (Taiwan). 27:267-290.
5. Duvick, D.N. 1965. Cytoplasmic pollen sterility in corn. Adv. Genet. 13: 2-58.
6. Erickson, J.R. 1969. Cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). Agro. Abst. p.6.
7. Gabelman, W.H. 1974. F₁ hybrids in vegetable production. Proc. 19th Intern. Hort. Congr. Warraw. 3:419-428.
8. Huang, C.S. 1977. An appraisal of rice breeding technique. J. Agr. Assoc. China (Taiwan). N.S. 100:5-21.
9. Meyer, V.G. and J.R. Meyer. 1965. Cytoplasmically controlled male sterility in cotton. Crop Sci. 5:444-448.
10. Sage, G.C.M. and M.J. De Insturiz. 1974. The inheritance of anther extrusions in two spring wheat varieties. Theor. Appl. Genet. 45:126-133.
11. Shinjyo, C. and T. Omura. 1966. Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice, *Oryza sativa* L. I. Fertilities of F₁, F₂ and off-springs obtained from their mutual reciprocal back crosses and segregation of completely male sterile plants. Jap. J. Breed. 16(Suppl. 1):179-180.
12. de Vries, A.Ph. 1973. Some aspects of cross pollination in wheat (*Triticum aestivum* L.). 2. Anther extrusion and ear and flowering pattern duration. Euphytica. 22:445-456.
13. Watanabe, Y., S. Sakaguchi and M. Kudo. 1968. On the male-sterile rice plant possessing the cytoplasm of Burmese Variety "Lead Rice". Jap. J. Breed. 18(Suppl. 2):77-78.

Searching for the Fertility Restorer and to Increase the Outcrossing
Rate of Hybrid Rice

by
Ra-Hshiong Buu & Chen-Seng Huang

Summary

To explore the commercial production of hybrid rice, it is necessary to search for the cytoplasmic male sterile (CMS) line and fertility restoring (Rf) line by a series of backcrossings and selection to establish the effect of interaction between cytoplasm and the restorer genes. The further study is needed to increase the outcrossing rate in order to obtain large quantities of CMS line seeds and the F_1 hybrid seeds.

The main purposes of this study were to maintain the CMS line established previously and to continuously search for Rf genes. Moreover, attempts were made to use some growth substances such as DPX-3778, Gibberellin (GA_3) and Indole acetic acid (IAA) and some herbicides such as 2,4-D, Stam F-34, Basagran and Saturn to change the flower habit of the CMS line, the maintainer, and the Rf line. The results obtained were summarised as follows.

(1) In the test-crosses for fertility restorer, we obtain 25 varieties (strains) that had Rf gene to restore the sterility of CMS variety Chen-Shan 97 (WA) among 144 entries tested, including the F_4 , F_5 lines of the cross related with IR 5032.

(2) The application of DPX-3778 to CMS Chen-shan 97 A and Reimei A lines at a range of 1000 - 3000 ppm effectively extended the duration of spikelet opening in a day. Some herbicides such as 2,4-D and Saturn seemed to promote the time of spikelet opening of the CMS- A and B lines.

(3) There were no significant difference in the seedset percentage of CMS-A line planted at various row ratios with B line in the field. Therefore, it is considered more economical to plant CMS-A and B line at a row ratio of 5:1 than 1:1 ratio.

(4) About 20% of off-type plants were found in the progenies of open-pollinated CMS lines in the ordinary rice field without any provision of avoiding pollen contamination. Therefore, it is necessary to setup an isolation field plot for the seed multiplication of CMS-A and B lines and the F_1 hybrid seed to avoid such a serious pollen contamination.