

文章编号: 1000-5692(2006)06-0689-05

植物细胞质雄性不育及其在育种中的应用

胡滨¹, 陈观平¹, 施农农¹, 卢江杰², 王慧中¹

(1. 杭州师范学院 杭州市生物化学与分子生物学重点实验室, 浙江 杭州 310018;

2. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 细胞质雄性不育的研究在杂种优势利用上具有重要的实践意义。主要以能量为切入点阐述了植物线粒体引起细胞质雄性不育的作用机制, 对提出的 2 种主要假说做了相关分析; 从转录后调控和翻译后调控 2 个层面对育性恢复的机制作了详细的阐述; 综述了近年来细胞质不育在植物育种上的应用所取得的成就。随着对多个物种全基因组和线粒体基因组序列测序的完成以及比较基因组学和生物信息学方法的建立和不断完善, 相信对细胞质雄性不育机制的研究会有很大的进展。参 23

关键词: 育种学; 基因工程; 细胞质雄性不育

中图分类号: Q343.34; S330 **文献标识码:** A

植物细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是一种母性遗传而导致的, 不能产生有活力的花粉的性状, 是高等植物中较为常见的生物学特征, 存在于约 150 个物种中。雄性不育在植物杂交育种中起着举足轻重的作用^[1]。科学家们多年来一直致力于 CMS 的研究, 并希望能揭开 CMS 的作用机制和途径。以往的研究主要集中在形态学和细胞学 2 个方面。近 20 多年来, 随着分子生物学实验技术的发展和植物基因组计划的推动, CMS 分子机制的研究蓬勃发展, 在不育相关区域的确定、该区域的转录谱、不育性的形成机制及恢复基因的作用机制等方面均取得了较大进展^[2]。文章主要以能量为切入点阐述了植物线粒体引起 CMS 的作用机理, 并且从相关育性恢复的机制和 CMS 在植物育种上的应用 2 个方面综述近年对植物 CMS 的研究与应用, 并对该领域今后的研究方向做了探讨。

1 植物细胞质雄性不育的形成机制

尽管有学者认为与 CMS 相关的位点有可能存在于叶绿体 DNA 上, 但越来越多的证据表明, 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 及其表达产物与 CMS 直接相关^[3]。经过多年的研究, 结合分子标记和细胞质融合, 比较 DNA 转录与翻译产物的差异等方法, 在很多物种上确定了与不育相关的线粒体的 DNA 区域, 但是关于 CMS 的机制仍然不是非常清楚。

在长期的研究过程中发现存在 2 个很显著的特征^[3]: ①大部分与 CMS 关联的基因表达都是组成型的, 但只出现局部的表型; ②在不同的 CMS 品系中观察到的表型不一致, 大多数都表现出由于绒毡层细胞的变异, 而导致花粉的失活, 但是在一些 CMS 品系中也发现花的表型受到了影响, 例如整

收稿日期: 2005-12-09; 修回日期: 2006-08-16

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目 (2004C32002); 浙江省杭州市科技计划资助项目 (200433248)

作者简介: 胡滨, 硕士研究生, 从事植物分子遗传学研究。E-mail: hbhubin1981@163.com. 通信作者: 王慧中, 教授, 博士, 从事植物分子遗传学研究。E-mail: whz62@163.com

个花粉囊消失或者出现花瓣状变异。

针对上述现象机制的探索,到目前为止主要存在2种假说:第1种假说认为CMS基因的产物会与一个存在于靶组织中的未知X因子相互作用。这种互作引发了毒蛋白的累积,从而使得花粉失去活性。这个假说解决了CMS基因组成型表达和只产生局部表型的矛盾。但是,该理论缺乏实验依据,因为到目前为止仍没有发现任何一个类似的X因子。第2种假说认为是由于CMS基因的产物干扰了线粒体的正常生理功能,从而导致呼吸作用或ATP合成效率降低。这种假说解释了不育系中花粉数量减少现象。Bergman等^[6]研究发现在不育烟草 *Nicotiana tabacum* 的花中存在ATP/ADP比率降低的现象,这个比率的降低干扰了细胞正常增殖,有可能造成花形态变异。另外一个关于向日葵 *Helianthus annuus* 的PET1-CMS品系研究提出^[7]:CMS的潜在机制可能导致绒毡层细胞的程序性死亡(programmed cell death, PCD)。可能是由于线粒体功能紊乱导致不能满足组织的能量需求,从而激发了该组织的细胞程序性死亡。

细胞代谢研究证据^[8]表明,在配子发育时期需要巨大的能量供应。这些证据包括:①减数分裂开始后,小孢子和绒毡层中线粒体的数量增加了数倍。②在花粉成熟过程中与呼吸作用有关的酶在表达水平上有显著的增加,而且另外一些与能量产生相关的丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶等酶都在花粉中特异性表达。以上是支持第2种假说成立的证据。该假说很好地解释了造成花粉失活和花变异的原因,但是,存在的问题是,在组成型表达的前提下,为什么其他器官在形成过程中的能量未受影响?

在烟草中发现的2个突变体为这一矛盾的解决提供了线索。通过烟草原生质体培养获得了2个mtDNA缺失品系,分别称为CMS I和CMS II,它们都是由于失去了线粒体中编码复合体I中一个亚基基因—*nad7*^[9],使得复合体I的产生和活性受到了很大的抑制^[10]。对生长和叶的表型都产生了一定影响,但是雌性可育,能够与相应的野生型杂交产生后代。然而雄性不育是有条件的,只有生长在温室,而且有充足光源的条件下,才会有少量的可育花粉产生,这主要得益于NADH脱氢酶的存在。在CMS中NADH脱氢酶的活性要比野生型高^[11,12],在CMS中同时得到加强的还有其他氧化途径,例如复合体II和复合体IV^[10],使得总体上CMS植株叶中的呼吸作用水平要比野生型中要高,但是在花粉和绒毡层细胞中的呼吸作用却只有野生型中的60%^[11]。而且,由于存在比较高水平的抗氧化酶,相对于野生型,不育系的抗旱能力和抗病能力更强^[13]。以上结果表明减弱呼吸作用可以导致雄性不育。

2 植物细胞质雄性不育系统的育性调控及其机制

通过对已经发现的150多种植物物种CMS品系和大量恢复系的研究发现,大部分CMS都是由于线粒体基因组中的开放阅读框造成的,而育性恢复基因(restorer gene for fertility,简称rf基因)主要是通过影响CMS相关的位点的表达而起作用。在rf基因存在情况下,CMS相关位点的表达得到校正,花粉败育现象得到抑制,使得育性恢复。尽管通过各种方法定位了许多与CMS相关的位点,但是对rf基因的研究特别是rf基因对育性恢复的机制研究大体上仍只能采用“黑箱”的方法。但是已有的研究表明rf基因的作用主要可能通过2条途径,一条途径是通过编码一种RNA加工酶,在转录后水平影响不育相关区域转录本的加工、编辑,进而导致蛋白谱的差异,引起育性恢复;另一条途径是编码一种蛋白酶,以翻译后作用机制、减少不育基因编码的蛋白质累积量而引起育性恢复^[2]。

在矮牵牛 *Petunia hybrida* 中已经克隆的育性恢复基因是直接通过改变CMS相关基因 *pcf* 的转录模式,导致 *pcf* 蛋白急剧减少而恢复育性,表现为转录后调控机制^[14]。Wen等^[15]通过对 *orf 355 ~ orf 77* 在雄配子体不同发育时期的表达动态分析,发现CMS-S的不育材料在花粉败育的整个时期均检测到2.8, 1.6 kb转录产物。当引入 *rf 3* 以后,雄配子体从淀粉积累期开始到小孢子发育成熟过程中2.8, 1.6 kb转录本变小,丰度降低。进一步的研究发现,是由于原来的长1.6 kb的转录本RNA,发生了解体,从而导致育性的恢复。袁美等^[16]在油菜 *Brassica campestris* 中的研究也为这种假设提供了佐证,通过对CMS三系的花蕾mtRNA进行检测Northern检测,表明在不育系中共转录的 *orf/atp6* 在三系中的转录丰度存在显著差异。

另一条途径的提出是从一些研究中发现, 不育相关基因的转录本长度和丰度在不育株和育性恢复株中并没有差异, 但是其编码的蛋白质在育性恢复株中特别是花器官中明显减少乃至消失。在对玉米 *Zea mays* T 型胞质不育系的 2 个恢复基因 *rf 1* 和 *rf 2* (已被克隆) 的研究过程中发现, *rf 1* 可以使得 *wf 13* 的毒蛋白累积量大大的减少, 并且只有当 2 个育性恢复基因同时存在的情况下, 育性才能被恢复, 可见翻译后作用机制在其中起着很大作用^[17]。Bellaoui 等^[18] 在对 *rfo* 基因对 *ogu* 胞质不育系恢复机理研究时发现, 由于 *rfo* 的存在使 *orf 138* 蛋白在花芽中的积累受到了严重的影响, 而对 *orf 138* 的分析却显示在两系中的表达产物的量不存在显著差异, 即在 mRNA 水平上是一致的, 恢复基因的作用可能是通过在翻译后水平上影响 *orf 138* 的稳定性, 从而表现为在恢复系中累积量的减少。

在研究过程中也发现了另外一些育性恢复机制, 例如从对克隆的玉米 *rf 2* 基因的研究中, 可以发现通过增加与能量产生相关的酶的数量也可以达到育性恢复的目的^[19]。而通过对菜豆 *Phaseolus vulgaris* pvs-CMS 的恢复基因 *fr* 的研究发现, 除了通过转录和翻译, 在 DNA 水平上加以作用, 同样可以抑制不育基因, 使得育性恢复^[20]。

3 CMS 在我国植物育种上的应用

与自交不亲和相比, 利用 CMS 配制杂交组合, 克服了人工授粉的种种弊端, 避免了环境条件对杂交率造成的影响, 在简化杂种优势育种上具有重要意义。经过育种家长期的培育和改良, 在很多物种中都成功建立起以胞质不育系为核心的三系配套体系, 并大规模应用于生产。

在我国, 杂交油菜面积已逾 260 万 hm^2 , 70% 左右杂交种属于细胞质雄性不育类型。大部分不育系来源于波里马 (Poi. cms) 和陕 2A (Shan 2A. cms)。波里马是傅廷栋 (1972 年) 发现的天然不育株, 其初期开放的花朵有微量花粉, 中后期花朵彻底不育。我国于 1996 年由湖南农业科学院利用该材料实现了三系配套, 并根据温度与育性的关系分为低温不育系、高温不育系和稳定不育系。国外以此材料育成的三系杂交品种也均通过注册审定, 并已在生产中大量推广应用。波里马也被认为是当前最有使用价值的油菜 CMS 类型。陕 2A 是李殿荣 (1976 年) 发现的人工杂交雄性不育株, 并于 1982 年实现了三系配套。陕 2A 的育性恢复由一对显性基因控制雄性不育系, 其花蕾雏状, 中空质软, 花萼略小, 花瓣小而窄, 雄蕊败育短缩, 花药较小呈三角形。配制的三系杂交品种秦油 2 号 (陕 2A \times 垦 C1) 是国际上第一个通过品种审定并大面积应用于生产的三系杂交种。

从 1973 年实现籼型水稻三系配套到 1986 年为止我国已育成籼、粳、糯型 600 多个水稻 *Oryza sativa* 雄性不育系。现在我国杂交稻生产中应用的细胞质雄性不育类型包括野败型、冈型、D 型等 10 个类型, 而且在水稻中也不乏利用基因工程创造的不育系。陶利珍等^[21] 以水稻愈伤组织和悬浮细胞作为基因枪转化的外植体, 把水稻花粉特异性基因 *ps1* 启动子与 *barnase* 构成的嵌合基因导入籼稻, 获得籼稻 5 个品种: Basmati-1、青油占、胜利 2 号、明恢 63、新山占 29 的转基因植株。获得的 *barnase* 转基因植株的育性比未转化对照明显降低, 表现为部分不育和完全不育。完全不育的植株花粉粒畸形, 不能被 I-KI 溶液染色, 但它们与正常植株杂交能够获得杂交种子。

在雄性不育系的抗病虫害和产量方面, 马春红等^[22] 对玉米不育系的田间试验结果表明, 雄性不育系的细胞异质性对玉米病害具有很大的缓冲作用, 对青枯病的抗性 CMS 品系比相应的保持系高出 10%, 并且由于在雄穗散粉期, CMS 品系节省大量的养分消耗, 使得雌穗发育充足, 导致最终增产 6%。从经济效益角度看, 按 5% 增产率计算, 雄性不育可增产 150~200 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$; 在制种方面, 节约费用达 450 元 $\cdot\text{hm}^{-2}$ 。

4 展望

20 多年来, 分子生物学技术和理论的迅速发展对 CMS 的研究起到了巨大的促进作用, 但 CMS 过程涉及花发育, 配子体发育过程中能量的调配, 基因的网络控制和时空调控等, 牵涉到的因素十分复杂, 使得在该领域一直没有一个明确的答案。我们认为在今后一段时间 CMS 的生物学研究和应用将集中在以下几个方面。

在机制研究上,进一步的工作需要彻底搞清线粒体开放阅读框编码的蛋白质对花粉育性影响的具体机制,阐明更多植物的不育基因与不育性状、育性恢复基因与不育基因间以及相应转录和翻译产物间的相互作用。从目前已克隆的5个植物CMS的 rf 基因看,除玉米 $rf2$ 基因外,其他4个都含有PPR基元序列,因此通过对基因组PPR基元序列的筛选来克隆植物CMS的 rf 基因有可能是一种捷径。

在雄性不育系应用方面,构建策略多样化和在更多物种中推广将是今后的2个重点课题。尽管利用原生质体融合、转基因等生物技术创造雄性不育系已有成功的研究报道,但是在实际应用中占的比例很小,大多数雄性不育系仍是通过人工杂交筛选获得,费时费力。同时也对杂交育种在其他物种中的应用造成了很大局限,所以利用基因工程创造不同品种的雄性不育系仍将是今后一段时间的工作热点。随着对CMS育性恢复机制研究深入,已经证明线粒体基因组中的开放阅读框是造成不育的重要原因,但是到目前为止,利用这些开放阅读框的特异性表达影响育性的研究尚未见报道,因此,线粒体开放阅读框在不育系构建上的应用也将是我们面前的一个大课题。

此外,利用叶绿体表达载体转化毒素基因构建不育系^[23]的研究成功为今后对CMS的研究和应用开辟了新的领域。

参考文献:

- [1] WISE R P, PRING D R. Nuclear-mediated mitochondrial gene regulation and male fertility in higher plants: light at the end of the tunnel [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, **99** (16): 10 240—10 242.
- [2] 危文亮, 王汉中, 刘贵华. 植物细胞质雄性不育与育性恢复的分子生物学研究进展 [J]. *遗传*, 2005, **27** (4): 651—658.
- [3] BUDASDFAR F, TOUZET P, De PAEPE R. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited [J]. *Genetica*, 2003, **117**: 3—16.
- [4] HANSON M R, BENTOLILIS S. Interaction of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development [J]. *The Plant Cell*, 2004, **16**: S154—S169.
- [5] KIFAGAWA J, POSLUSZNY U, GERRATH J M, *et al.* Developmental and morphological analyses of homeotic cytoplasmic male sterile and fertile carrot flowers [J]. *Sex Plant Reprod*, 1994, **7**: 41—50.
- [6] BERGMAN P, EDQVIST J, FARBOS I, *et al.* Malesterile tobacco displays abnormal mitochondrial *atp1* transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, **42** (3): 531—544.
- [7] BALK J, LEAVER C J. The PET-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release [J]. *Plant Cell*, 2001, **13** (8): 1 803—1818.
- [8] BUDAR F, TOUZET P, DE PAEPE R. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited [J]. *Genetica*, 2003, **117**: 3—16.
- [9] PLA M, MATHIEU C, DE PAEPE R, *et al.* Deletion of the last two exons of the mitochondrial *nad 7* gene results in lack of the *nad 7* polypeptide in a *Nicotiana sylvestris* CMS mutant [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, **248** (1): 79—88.
- [10] GUTIERRES S, LELANDIS C, DE PAEPE R, *et al.* A mitochondrial sub-stoichiometric *orf 87-nad 3-nad1 exon A* cotranscription unit present in Solanaceae was amplified in the genus *Nicotiana* [J]. *Curr Genet*, 1997, **31**: 55—62.
- [11] SABAR M, De PAEPE R, KOUCHKOVSKY Y. Complex I impairment, respiratory compensations and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris* [J]. *Plant Physiol*, 2000, **124** (3): 1 239—1 250.
- [12] BRANGEON J, SABAR M, GUTIERRES S, *et al.* Defective splicing of the first *nad 4* intron is associated with lack of several complex I subunits in the *Nicotiana sylvestris* NMS1 nuclear mutant [J]. *Plant J*, 2000, **21** (3): 269—280.
- [13] De PAEPE R, FORCHIONI A, CHETRIT P, *et al.* Specific mitochondrial proteins in pollen: presence of an additional ATP synthase beta subunit [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, **90** (13): 5 934—5 938.
- [14] BENTOLILIS S, AIFONSO A A, HANSON M R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, **99** (16): 10 887—10 892.
- [15] WEN L, CHASE C D. Pleiotropic effects of a nuclear restorer-of-fertility locus on mitochondrial transcripts in male-sterile and S male-sterile maize [J]. *Curr Genet*, 1999, **35** (5): 521—526.
- [16] 袁美, 杨光圣, 傅延栋, 等. 甘蓝型油菜 *pd* CMS 育性恢复基因对 *orf 224/atp 6* 的转录调控 [J]. *遗传学报*, 1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

2003, **30** (5): 469—473.

- [17] CUI X Q, WISE R P, SCHNABLE P S. The *rf* 2 uncler restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize [J]. *Science*, 1996, **272**: 1 334—1 336.
- [18] BELLAOUI M, GRELON M, PELLETIER G, *et al.* The restorer *rfo* gene acts post-translationally on the stability of the αf 138 Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed cybrids [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, **40** (5): 893—902.
- [19] LIU F, CUI X Q, HORNER H T, *et al.* Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize [J]. *The Plant Cell*, 2001, **13**: 1 063—1 078.
- [20] HE S, YU Z H, VALLEJOS C E, *et al.* Pollen fertility restoration by nuclear gene *fr* in CMS common bean: an *fr* linkage map and the mode of *fr* action [J]. *TAG*, 1995, **90**: 1 056—1 062.
- [21] 陶利珍, 凌定厚, 梁承邨, 等. 花粉特异性核糖核酸酶基因诱导籼稻雄性不育及其遗传研究 [J]. 作物学报, 1999, **25** (5): 529—535.
- [22] 张明龙, 章徐鸯, 林宝刚, 等. 国内外油菜细胞质雄性不育 (CMS) 系统的研究进展 [J]. 黑龙江农业科学, 2004 (1): 36—38.
- [23] OSCAR N R, HENRY D. Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of β -kethiolase [J]. *Plant Physiol*, 2005, **138**: 1 232—1 246.

A review of the study and application on cytoplasmic male sterility gene modification in plants

HU Bin¹, CHEN Guan-ping¹, SHI Nong-nong¹, LU Jiang-jie², WANG Hui-zhong¹

(1. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Hangzhou City, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310018 Zhejiang, China; 2. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Cytoplasmic male sterility (CMS) is of tremendous importance in plant breeding. This review focuses on the progress of CMS studies from three aspects: (1) CMS of mitochondria through interference of the energy supply. (2) the effects of a fertility restorer gene, and (3) the application of CMS in genetic engineering of plant male sterility. The prospects of further studies on this subject are also discussed. [Ch, 23 ref.]

Key words: breeding; gene engineering; cytoplasmic male sterility