

植物细胞质雄性不育

王春国 常彩涛¹ 古瑜 孙德岭¹ 宋文芹*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071; ¹天津科润蔬菜研究所, 天津 300382)

摘要 近年来国内外对植物细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)在细胞学、生理生化及分子遗传学等方面的研究又取得了新的进展。特别是对育性恢复基因的定位、克隆的研究已取得一定突破,发现编码含保守PPR(pentatricopeptide repeat)模体蛋白的基因在多种植物中与育性恢复密切相关。

关键词 细胞质雄性不育; 细胞学; 生物化学; 分子遗传学

细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)是广泛存在于高等植物中的一种自然现象,表现为母体遗传、花粉败育和雌蕊正常。可被显性核恢复基因恢复育性。迄今已在150多种植物中发现了CMS^[1]。利用CMS培育不育系进行杂交制种,已成为国际制种业的主要趋势,其可免去人工去雄,节省大量的人力物力,并可提高杂交种子的纯度,增加农作物的产量。但在实际的选育过程中经常会遇到所选的不育系胞质单一、配合力低及不育性不稳等诸多问题,而这些问题的解决又缺少足够的理论依据。同时它又是研究核质互作的理想材料。因此,长期以来人们对不育机制的探讨从未终止过。对CMS从形态学、细胞学、生理生化及分子生物学方面进行了大量的研究。

1 细胞学研究

由于CMS存在的广泛性,CMS植物花粉败育具体表现也各式各样,形态学上一般表现为花器小,花丝变短,花药瘦小等。根据败育发生的时期可把CMS分为两类:一类为孢子体不育,可发生在花药造胞细胞增殖至小孢子母细胞进行减数分裂的整个过程,如大豆CMS系NJCMSIA花粉败育发生在二胞花粉期,主要表现为小孢子内生核与营养核消失,胞质紊乱,外壁内层及内壁停止发育,液泡增大,原生质部分解体^[2]。棕色棉CMS系败育发生在小孢子期,表现为造胞细胞核仁增大,细胞质液泡化,细胞畸形,小孢子母细胞穿壁普遍、多核仁、染色体行为异常,细胞之间互相黏连。D型胞质不育小麦的败育亦发生在小孢子期表现为质膜破碎,细胞器解体或退化,绒毡层持续

不解体^[3]。此外,胞质不育大白菜、番茄的败育也都发生在小孢子期,且在细胞学上也表现为质膜的解体和绒毡层的异常^[4]。可见孢子体不育在细胞学表现上具有一些共性,这为其判别提供了一定的依据;另一类为配子体不育,主要发生在小孢子进行有丝分裂形成配子的过程中。而有关这方面的研究较少,有报道表明M-CMS玉米为该类型。在这两种类型的败育中绒毡层发育异常与败育密切相关^[5]。绒毡层由一种独特的分泌细胞组成,它在花粉形成过程中行使着重要的功能。在花药发育早期,绒毡层包围着花粉囊,为发育的小孢子提供各种营养物质,在小孢子母细胞完成减数分裂后,绒毡层又能分泌胼胝质酶,分解胞囊四分孢子的胼胝质壁,释放小孢子。它的过早解体或延迟退化都可能造成孢子发育的供养不足或使之不能正常分离,从而造成败育。这种现象早就被观察到,但绒毡层细胞的发育异常由何而引起?对它分子生物学的研究是否可以作为研究CMS分子机制的一条途径?值得研究者思考。

2 生理生化研究

植物生长发育过程涉及到各种酶、生长物质、营养物质等各类成分,它们之间的协同作用是植物正常生长发育所必需的,CMS作为植物界中一种变异现象,它的生长发育特别是花粉的发育在某种程度上已经破坏了各物质之间的协同关系,阻碍了它

收稿日期:2004-11-08 接受日期:2005-05-16

天津市自然科学基金资助项目(No.013614711)。

* 通讯作者。Tel: 022-23508241, Fax: 022-23497010, E-mail: songwq@eyou.com

们之间的交流。像雄蕊部位酶活性的变化,内源激素量的差异,营养物质的积累多少及物质代谢、能量代谢快慢等都会影响到花的育性。

2.1 CMS 与酶活性变化

同工酶分析表明在不同的材料中过氧化物酶、细胞色素氧化酶、超氧化物歧化酶、谷氨酸脱氢酶等在不育系和保持系之间存在酶活上的差异。对6种具有应用前景的CMS小麦和其保持系中国春小麦和华麦8号进行的谷胱甘肽过氧化物酶的活性比较表明,CMS小麦远低于其保持系中国春小麦和华麦8号^[6]。耿三省等^[7]对CMS辣椒花药的生化分析也表明不育系中过氧化氢酶活性明显低于保持系。研究认为过氧化物酶能清除细胞内的活性氧,减少活性氧对细胞分子和结构的损害,不育系花粉发育异常可能与活性氧的含量高有关。

2.2 CMS 与植物激素

生长激素如赤霉素和多胺有利于雄性器官的发育,CMS水稻不育株幼穗或花药中赤霉素含量显著低于相应可育株,此外,外施赤霉素能促进某些植物雄性育性表达。多胺亦是一种重要的促雄激素,在CMS玉米中,结合多胺的含量极低,在CMS水稻中也发现了类似的现象,进一步的研究表明用多胺处理CMS水稻、油菜等可使花粉可育度有轻度提高^[8]。而生长素、细胞分裂素、乙烯和脱落酸被普遍认为对植物的雄性发育具有抑制作用。乙烯的过度释放是造成CMS的主要诱因之一,这已在多种CMS植物上得到了证实^[9],而研究发现生长素对雄性发育的抑制是由于高浓度的生长素诱导了乙烯的产生。同时在大多数CMS植物中发现细胞分裂素含量普遍较其保持系高,有人认为不育系花药中高含量的细胞分裂素抑制或阻止了花药组织的抗氧呼吸,导致不育花药呼吸系统和能量代谢系统紊乱,进而造成小孢子发育受阻和败育。也有研究表明在一些不育株中脱落酸含量明显低于其保持系,外施脱落酸亦可抑制某些植物雄花的发育。但具体机制仍不详。

2.3 CMS 与营养物质

对影响CMS花发育的营养物质主要集中在一些可溶性蛋白质、游离氨基酸、碳水化合物方面。萝卜CMS系与保持系的物质代谢研究表明,在不育性的花蕾中可溶性蛋白质、多糖、淀粉及游离脯氨酸含量均低于保持系。花蕾中多糖和淀粉含量低会减缓能量代谢致使细胞产能不足,同时,使花中各部

分发育受阻造成败育^[10]。游离脯氨酸是花发育过程中的一种重要氨基酸,它可为花发育提供重要的碳源和氮源,并且可直接用于蛋白质的合成。因此,游离脯氨酸含量低可直接影响发育过程中一些酶和结构物质的合成。

对CMS植物生理生化方面的研究国内学者做了大量工作,但还不系统,不能从深层次解释一些问题,如果把新近出现的蛋白质组学的有关概念引进来,相信还有很大的研究空间。

3 分子遗传学研究

由于CMS系和保持系具有相同的核背景,且CMS为母系遗传,因此研究者普遍认为导致CMS的主要因素可能与植物胞质中的遗传系统——线粒体、叶绿体或线粒体的类质粒有关。但由于技术方法等各方面的原因阻碍了人们对CMS本质的认识。直到进入20世纪80年代,随着分子生物学的发展及细胞器DNA分离技术的日臻完善,才使得对CMS分子机制的研究有了长足的发展。

3.1 CMS 与线粒体基因组

根据目前的研究,线粒体基因组的变异重组与CMS的关系最为密切。通过对不同材料的CMS系和保持系线粒体DNA的RFLP、RAPD、AFLP等多态性分析表明,CMS系和保持系在线粒体基因组结构上具有显著差异^[11,12]。这可能与植物线粒体基因组自身的特点有关。与动物和真菌的线粒体基因组比起来,植物线粒体基因组大(200~2500 kb)而且复杂,内含有许多同向或反向重复序列,这些序列的存在使得线粒体基因组可与核基因组、叶绿体基因组或自身之间发生高频重组,重组可能引起结构和功能的改变,这极可能是导致CMS的主要原因。通过比较物理图谱法、转座子标记法、互补实验等获得了几个与CMS相关的线粒体基因区段。如CMS高粱的*orf107*, T-CMS玉米的*T-urf13*区, Polima型CMS油菜的*orf224*区, CMS水稻的*orf79*区, CMS矮牵牛的*pcf*区, CMS菜豆的*pvs*区, Ogura型CMS萝卜的*orf138*等^[11,13]。分析发现这些相关区段一般都与线粒体所编码的功能基因紧密连锁并与其共转录。对CMS相关线粒体基因的研究,特别是对这些基因的转录、转录后调控、翻译及翻译后调控的研究,是当前CMS分子机制研究的热点。同时研究也发现线粒体RNA的编辑可能与CMS的发生密切相关^[14]。

此外，在一些植物的线粒体上还存在着一种环状或线状的小DNA分子，被称之为类质粒DNA分子，其也具有自主复制的能力，一般在其末端都含有反向重复序列，且与核基因组序列有同源区，在CMS系和保持系之间存在差异。Yamaguchi等^[15]首先在BT型水稻不育系发现类质粒DNA的存在，其大小分别为1.5 kb和1.2 kb，而在保持系中未发现。Mignouna等^[16]在野败型珍珠粟97A水稻中也发现一个2.1 kb的类质粒DNA。此外，在玉米、高粱、甜菜等CMS系中也发现了类质粒的存在。但目前只是从一些现象上推测类质粒DNA可能与CMS相关，还缺少具有说服力的实验依据。

3.2 CMS与叶绿体基因组

CMS与叶绿体的关系目前还存在很大的争议。相对于植物线粒体而言，叶绿体基因组较为保守也较小(120~160 kb)，因此对它的认识要比对线粒体深入的多。研究发现植物叶绿体一般分为4个区：两个反向重复区，大单拷贝区和小单拷贝区。目前已有多种植物叶绿体的物理图谱被构建。对高粱的CMS系及相应保持系的叶绿体*ndhD*基因的酶切分析表明，CMS系与相应保持系之间存在明显的差异，且在后续的研究中克隆到了保持系所特有的两个叶绿体基因片段ps1A1和ps1A2^[17,18]。但Levings等^[19]对玉米，Kadowaki等^[20]对水稻的叶绿体DNA的酶切电泳未发现不育系和保持系之间存在差异。对细香葱、烟草等的研究也发现叶绿体DNA与CMS无关。因此，叶绿体基因组是否与CMS有关还有待进一步研究。

3.3 CMS与核基因组

对胞质遗传物质的研究无疑加深了人们对CMS现象分子机制的认识，但是CMS是一种核质互作的结果，因此核基因组在CMS发生过程的作用是不容忽视的。研究表明在核基因组中可能存在育性恢复(restorer of fertility, *Rf*)基因。在*Rf*基因存在下，与CMS相关的线粒体等胞质DNA的突变表型可得到有效的校正，育性得到恢复。

3.3.1 *Rf*基因对CMS相关基因的作用 *Rf*基因可对CMS基因转录本的稳定性、转录后加工、翻译及翻译后加工、甚而基因的结构产生影响。对CMS小麦(*T. timopheevi*)的研究表明，CMS相关片段*orf256*与线粒体基因*cox1*形成嵌合基因*orf256/cox1*共转录，在CMS系中转录起始点位于*orf256*的5'非翻译区，*orf256*完整转录能编码 M_r 为7000的蛋

白质，其结合于线粒体膜上，直接影响花粉育性。而通过杂交引入*Rf*基因后，嵌合基因的转录本变小，且起始点位于*orf256*编码区内不能翻译形成蛋白质^[21]。胞质来源于1s1112c的CMS高粱在其线粒体上的不育相关片段*orf107*编码 M_r 为11800的蛋白质在线粒体内大量积累，而在杂交引入*Rf*基因后*orf107*的转录本被加工成小片段，从而无全长转录本产物的存在，育性得以恢复^[22]。*Rf*基因对CMS相关基因转录后加工的影响在胞质源于Chinsurah boroII的水稻中找到了例证。Chinsurah boroII CMS水稻线粒体中有两类*atp6*基因，*N-atp6*与正常胞质的相同，*S-atp6*为不育系所特有，二者编码区相同只是在3'非编码区有差异。在不育系中*S-atp6*转录本为2.0 kb，不能被进一步加工形成1.5 kb的正常转录本，编码形成不正常的ATP6蛋白，抑制或竞争正常的ATP6蛋白使线粒体功能受损。而在引入*Rf*基因后*S-atp6* 2.0 kb的转录本被有效加工，形成正常转录本^[23]。此外在pol型CMS油菜^[24]、S-CMS玉米^[25]、CMS细香葱^[26]及CMS芥菜^[27]等中都发现*Rf*基因对CMS相关基因转录及转录后加工的影响。因此认为*Rf*基因对CMS基因转录水平的影响是*Rf*基因常见的一种作用方式。在对CMS菜豆的研究发现，其育性恢复可通过核基因上的两个恢复基因*Fr1*、*Fr2*通过不同的机制来完成。*Fr1*可直接取消与不育对应的3.7 kb的*pvs*片段。从而永久性的恢复育性。而*Fr2*通过在翻译后水平影响线粒体不育片段*pvs*编码多肽ORF239的稳定性，对育性进行调节^[28]。Ogura型胞质不育萝卜的*Rf*基因对线粒体嵌合读码框*orf138*的作用方式也是如此^[29]。总之，*Rf*基因对CMS的影响是确实存在的，它可以对CMS相关基因在各个层次上进行调控。但*Rf*基因的本质到底如何，这显然更吸引研究者的兴趣。

3.3.2 *Rf*基因的克隆 很长一段时期内，由于在技术及方法等方面的局限，只有T-CMS玉米的恢复基因*Rf2*得到克隆，并确认其为核编码的乙醛脱氢酶基因^[30,31]。但随着研究的深入，最近有人也对其是否是恢复基因产生了置疑，Touzot^[32]认为T-CMS玉米的*Rf*基因是育性基因，而不是育性恢复基因。抛开概念上的争议，当前这方面的研究已取得了很大的进展，特别是在人类基因组计划及其他模式生物基因组计划的带动下，大规模测序及后期的数据处理已不是那么的困难。研究者已不再局限于针对育性恢复基因的遗传定位及图谱的构建，而

是在此基础上进行基因的克隆。BT-CMS 水稻的育性恢复基因 *Rf-1* 被限定在一个只有 22 kb 大小的区域上^[33]，Kosena 型 CMS 萝卜的育性恢复基因限定在一个 43 kb 的区域上^[34]，CMS 矮牵牛的育性恢复基因与一个长度为 37.5 kb 的 BIBAC 克隆共分离^[35]。并发现 BT-CMS 水稻 *Rf-1* 基因所在的区域能编码含 PPR (pentatricopeptide repeat) 模体的蛋白质，该模体样蛋白质在 Ogura 型 CMS 萝卜的育性恢复基因 *Rfo* 及 CMS 矮牵牛的 *Rf* 基因中也都存在^[36-38]。这一发现似乎预示着一些胞质不育植物的 *Rf* 基因可能存在一些共性，随着研究的深入，这方面可能会取得大的进展，值得研究者注意。

3.4 基因工程创造 CMS 系

Mariani 等^[39]早在 20 世纪 90 年代初就利用转基因的方法获得 CMS 株，其利用烟草花药绒毡层专一性表达的 *TA29* 基因的启动子与解淀粉芽孢杆菌的核糖核酸水解酶 (*barnase*) 基因构成嵌合基因，导入植物体内，通过 *TA29* 基因启动子的专一性使 *barnase* 基因特异的在花药绒毡层组织细胞内得以表达，降解绒毡层细胞内的 RNA，从而阻碍花药绒毡层的发育，使花粉败育。这是当前采用转基因获得 CMS 系的主要手段。此外，利用反义技术等方法构建 CMS 系也有报道^[40]，但效果并不理想。这方面的突破还有待于对 CMS 分子机制的进一步认识。

4 小结

CMS 是植物在发育过程中核质互作的一种结果，其发生机制可能与其体内 3 个遗传系统——线粒体、叶绿体、核基因都有关。它们有相对独立的一面，但更多的可能是它们之间相互的影响、相互联系、相互渗透。这就决定了 CMS 发生的复杂性。当前大量 CMS 相关线粒体基因的发现，无疑加深了对这一现象分子机制的认识，但这些嵌合基因是如何产生的，在这过程中叶绿体基因及核基因发挥了何种作用，还有太多的未知。因此要想加深对 CMS 机制的认识，一方面应该采用新的技术、新的思路克隆出更多的 CMS 相关基因及恢复基因，并对这些基因的转录、转录后加工等的机制及所编码的产物进行深入研究。另一方面应充分利用当前所飞速发展起来的生物信息学，利用其对海量数据的

处理能力，使之与实验科学有机结合，加深对这些基因及其产物之间相互关系的研究。只有这样才能为揭示植物 CMS 之谜提供更多更有力的证据，才能为利用分子手段获得 CMS 系提供更有力的指导，为杂种优势的利用创造更广阔的空间。

参考文献(References)

- [1] Schnable SP *et al.* *Trends Plant Sci*, 1998, **3**: 175
- [2] 丁德荣等. *大豆科学*, 2001, **20**: 167
- [3] 杨景成等. *作物学报*, 2001, **27**: 91
- [4] 郭晶心等. *园艺学报*, 2001, **28**: 409
- [5] 王伟等. *西北植物学报*, 1998, **18**: 361
- [6] 史红梅等. *武汉大学学报(理学版)*, 2001, **147**: 771
- [7] 耿三省等. *北京农业科学*, 1997, **15**: 26
- [8] 田长恩等. *作物学报*, 1999, **25**: 602
- [9] 夏涛等. *华北农学报*, 1996, **11**: 68
- [10] 魏毓棠等. *辽宁农业科学*, 2001, (4): 8
- [11] Jaiswal P *et al.* *Theor App Genet*, 1998, **96**: 791
- [12] 盖树鹏等. *农业生物技术学报*, 2002, **10**: 94
- [13] Budar F *et al.* *C R Acad Sci III*, 2001, **324**: 543
- [14] Gallagher LJ *et al.* *Curr Genet*, 2002, **42**: 179
- [15] Yamaguchi H *et al.* *Jpn J Genet*, 1983, **58**: 607
- [16] Mignouna H *et al.* *Theor App Genet (Historical Archive)*, 1987, **74**: 666
- [17] 范昌发等. *遗传学报*, 2002, **29**: 907
- [18] 孙春响等. *应用与环境生物学报*, 2003, **9**: 506
- [19] Levings CS *et al.* *Science*, 1990, **250**: 942
- [20] Kadowaki K *et al.* *Mol Gen Genet (Historical Archive)*, 1990, **224**: 10
- [21] Hedgcoth C *et al.* *Curr Genet*, 2002, **41**: 357
- [22] Tang HV *et al.* *Plant J*, 1996, **10**: 123
- [23] Kazama T *et al.* *FEBS Lett*, 2003, **544**: 99
- [24] Menassa R *et al.* *Plant J*, 1999, **17**: 491
- [25] Zhang SQ *et al.* *Yi Chuan Xue Bao*, 2003, **30**: 277
- [26] Engelke T *et al.* *Mol Genet Genomics*, 2004, **271**: 150
- [27] Pathania A *et al.* *Theor Appl Genet*, 2003, **107**: 455
- [28] Sarria R *et al.* *Plant Cell*, 1998, **10**: 1217
- [29] Bellaoui M *et al.* *Plant Mol Biol*, 1999, **40**: 893
- [30] Liu F *et al.* *Plant Cell*, 2001, **13**: 1063
- [31] Skibbe DS *et al.* *Plant Mol Biol*, 2002, **48**: 751
- [32] Touzet P. *Trends Plant Sci*, 2002, **7**: 434
- [33] Akagi H *et al.* *Theor Appl Genet*, 2004, **108**: 1449
- [34] Imai R *et al.* *Mol Genet Genomics*, 2003, **269**: 388
- [35] Bentolila S *et al.* *Mol Genet Genomics*, 2001, **266**: 223
- [36] Komori T *et al.* *Plant J*, 2004, **37**: 315
- [37] Brown GG *et al.* *Plant J*, 2003, **35**: 262
- [38] Bentolila S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 10887
- [39] Mariani C *et al.* *Nature*, 1990, **347**: 737
- [40] 王俐等. *生命科学*, 2001, **13**: 222

Cytoplasmic Male Sterility in Plants

Chun-Guo Wang, Cai-Tao Chang¹, Yu Gu, De-Ling Sun¹, Wen-Qin Song*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; ¹Tianjin Vegetable Research Institute, Tianjin 300382, China)

Abstract In recent years, the new advances correlated with cytoplasmic male sterility (CMS) in the fields of cytology, biochemistry and molecular genetics, have been achieved. Especially in the cloning and identification of the restorer genes, great progress had been made. It indicates that some genes that encode proteins which have conservative pentatricopeptide repeat (PPR) motif are closely associated with fertility restoration in some CMS plants. In this paper, the recent advances all above are reviewed and the future research direction of it also discussed.

Key words cytoplasmic male sterility; cytology; biochemistry; molecular genetics

Received: November 8, 2004 Accepted: May 16, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Tianjin (No.013614711)

*Corresponding author. Tel: 86-22-23508241, Fax: 86-22-23497010, E-mail: songwq@eyou.com