

植物细胞质雄性不育与育性恢复的分子机理*

黄青阳

朱英国

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

(武汉大学遗传研究所 武汉 430072)

MOLECULAR MECHANISM OF THE CYTOPLASMIC MALE STERILITY AND ITS FERTILITY RESTORATION IN PLANTS

Huang Qingyang

Zhu Yingguo

(College of Life Science, Central China Normal
University Wuhan 430079)

(Institute of Genetics, Wuhan
University Wuhan 430072)

关键词 细胞质雄性不育, 恢复基因, 植物

Key words Cytoplasmic male sterility, Restorer gene, Plant

雄性不育是指植株的雄性生殖系统不能正常发育产生有功能的花粉, 而其雌性生殖系统发育和营养生长完全正常的一种生物学现象。雄性不育在植物界广泛存在。根据遗传特点, 通常将植物雄性不育分为核不育 (genic male sterility) 和细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 两大类型。植物雄性不育是农作物杂种优势利用的基础, 另一方面, 它又是研究细胞质遗传、核质互作和花粉发育的极好材料, 因此, 成为近年来植物遗传育种和分子生物学研究的一大热点。由于分子生物学实验技术的发展和植物基因组计划的推动, 植物雄性不育研究在过去十几年中取得了长足的进步。笔者仅就细胞质雄性不育与育性恢复分子机理的研究进展作一综述。

1 植物细胞质雄性不育相关基因(位点)的鉴定

植物一般有细胞核、叶绿体和线粒体三套遗传体系。由于细胞质雄性不育表现为母性遗传, 因此, 人们鉴定细胞质雄性不育相关基因(位点)多从 CMS 系与可育系间叶绿体基因组和线粒体基因组的比较入手, 寻找两者之间的差异。将 CMS 植株与可育植株的原生质体融合, 杂种或它们后代的叶绿体基因组往往是亲本之一型, CMS 体细胞杂种可具有可育亲本的叶绿体基因组, 可育的体细胞杂种可具有不育亲本的叶绿体基因组^[1]。Kadowaki、刘炎生等分别比较了水稻黎明 A 与水稻黎明 B、珍汕 97A 与珍汕 97B 叶绿体基因组的酶切图谱, 发现不育系与保持系之间没有多态性^[2,3]。赵世民等比较了野败型、D 型

收稿日: 1998-12-16, 修回日: 1999-03-12。第一作者: 男, 1963 年 8 月出生, 博士, 从事植物分子发育遗传学及植物雄性不育分子机理研究。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770455)。

不育系和保持系叶绿体基因组的体外翻译产物,结果没有找到差异多肽^[4]。迄今,尚未在任何细胞质雄性不育植物的叶绿体基因组中找到一个可能与其育性密切相关、表达产物受恢复基因影响的 DNA 片段,普遍认为线粒体基因组是 CMS 相关基因的载体^[5]。

要确定 CMS 相关基因(位点),通常采用如下几种策略:①用 RFLP、RAPD、AFLP 和 PCR 等方法,比较 CMS 系和保持系 mtDNA 的差异;②比较 CMS 系与其自发回复突变体间 mtDNA 的差异;③比较 CMS 系与可育株原生质体融合产生的胞质杂种中,CMS 株与可育株 mtDNA 的差异;④比较 CMS 系与保持系(可育系)在 mtRNA 编辑(editing)、剪接(splicing)、加工(processing)、翻译等方式上的差异;⑤比较 CMS 系与其 F₁mtDNA 转录与翻译产物的差异。利用这些方法,目前已在玉米、矮牵牛、油菜、菜豆、向日葵、水稻等植物中确定了 CMS 相关基因(位点)。

1.1 玉米

玉米细胞质雄性不育按恢复系、保持系关系分为 T、S、C 三类,其中以 T 胞质在生产上利用最广,其分子机制研究得最深入。1986 年,Dewey 用 CMS-T 胞质的 mtRNA 和可育玉米的 mtRNA 与 CMS-T 玉米 mtDNA BamHI 基因文库作 Northern 分析,找到了 1 个 CMS-T 特异的含 9.0 kb 的 BamHI 片断克隆;该片段上有 1 个 3 547 bp 的核苷酸序列,该序列上包含 T-urf13 和 ORF25 2 个 ORF;urf13 的 5'侧翼区与 atp6 基因相同,其编码区含 155 个密码子,前 88 个密码子与 rrn26 基因的 3'非转录区同源,接下来的 9 个密码子来源不明,最后的 18 个密码子与 rrn26 转录区同源^[6]。urf13 编码—13 kD 的多肽,只存在于 CMS-T 型玉米线粒体膜上^[7,8]。ORF25 编码—25 kD 的多肽,ORF25 在所有玉米的线粒体中均能转录,是一个正常的线粒体基因。Wise 等用组织培养方法获得了 T 型雄性不育的回复突变体,这些回复突变体的 mtDNA 在 urf13 位点上均发生了结构变化(缺失、移码突变等),如在回复突变体 T₁ 中,urf13 基因发生了 1 个移码突变,产生了 1 个提前的终止码,造成 urf13 蛋白仅有 74 个氨基酸^[9]。这些结果证明了 urf13 与 T 型玉米 CMS 的相关性。

1.2 矮牵牛

矮牵牛只有一种细胞质雄性不育类型。1983 年,Boeshore 将矮牵牛可育株与不育株的原生质体进行融合,然后对体细胞杂种再生植株的 mtDNA 进行 RFLP 分析,发现在 CMS 亲本和稳定表现 CMS 的体细胞杂种中存在一特异 DNA 区域,在可育亲本及稳定的可育体细胞杂种中则不存在这一区域;有少数杂种表现不稳定的育性分离,总有部分植株自动回复,这些回复的植株亦不存在这一区域;由此推断这一区域与 CMS 有关,命名为 S-Pef^[10-12]。S-Pef 由 pef(Pentunia CMS-associated fused)基因、nad3 和 rps12 3 个阅读框组成,pef 基因开始 35 个密码子与 atp9 相同,中间是来自 cox II 2 个外显子的 158 个密码子,最后 205 个密码子来源不明,称 urfs。pef 基因仅在不育系中表达,而且花药中的表达量是叶中的 4~5 倍^[13]。pef 基因先翻译成 43 kD 的蛋白质前体,然后加工成 25 kD 的多肽。序列测定表明,25 kD 的多肽是由 urfs 编码的,结合在线粒体膜上^[14,15]。nad3 和 rps12 是正常的线粒体基因,与 pef 共转录^[16,17]。

1.3 油菜

油菜的 CMS 有 ogu、pol 和 nap 3 种主要类型。在 CMS-Ogura 胞质中,通过原生质体融合产生胞质杂种;发现在表现 CMS 的胞质杂种中存在 1 个 2.5 kb 的 NcoI 片段,该片段在 CMS 胞质杂种回复突变体和可育系中均不存在^[18]。在 Nco2.5 中存在 orf138 和 orf158 2 个 ORF、1 个 tRNA 基因(trnM)。orf138 和 orf158 共转录成 1.4 kb 的 mRNA,orf138 的转录本为不育的胞质杂种特有,翻译为—19 kD 的多肽,orf158 的转录本在可育与不育胞质杂种中都存在^[19,20]。在 CMS-Polima 胞质中,位于 atp6 基因上游的嵌合基因 orf224 与 CMS 密切相关。orf224 由 orfB5'端 58 个氨基酸编码序列和未知来源的 501 个核苷酸序列组成,orf224 的下游是截断的 trnM 假基因和 atp6 基因,而正常胞质 atp6 基因的 5'上游只有完整的 trnM 假基因^[21,22]。对油菜体细胞杂种后代的分析表明,凡表现 pol 胞质不育的杂种后代都含有 orf224/atp6 基因座位,该座位与 polCMS 性状高度连锁^[23]。Handa 等报道了与 orf224 类似的 pol-urf

基因^[24]。在 nap cms 的 mtDNA 中存在一个特异的 orf222, 它与 nad5 和 orf139 基因共同转录, orf222 编码的蛋白质与 polCMS 特有的 orf224 编码的蛋白质有 79% 的相似性, 在正常胞质的甘蓝型油菜中没有 orf222 基因, 因此该基因可能是 napCMS 相关基因位点^[25]。

1.4 菜豆

菜豆有 5 种来源的 CMS 胞质, 其中 3 种来源于 *P. coccineus*, 1 种来源于 *P. polyanthus*, 1 种来源于 *P. vulgaris* cv. G08063 (即 CMS-Sprite)。在 CMS-Sprite 中, 恢复基因 Fr 导入后使一部分 mtDNA 丢失, 而且 CMS 系的复育突变株亦丢失这一区段, 因此丢失的这部分 DNA 区域必然与花粉的育性有关。丢失区段位于 -25 kb 的 Sst I 片段上, 其中 -3 736 bp 的区段为 CMS 胞质特有, 在可育系和复育系中不存在, 命名为 pvs (Phaseolus vulgaris Sterility Sequence)^[26-28]。pvs 的 3' 和 5' 侧翼区为 2 个重复序列, 5' 侧翼区 (重复 X) 含 1 个 atpA 基因和 orf209; orf209 的起始码与 atpA 的终止码重叠, orf209 终止码下游 12 bp 处为 pvs 的 5' 端; pvs 区含有 orf98, orf97 和 orf239 3 个 ORF, 其中 orf98, orf239 的方向与 atpA 和 orf209 相同, 与 orf97 方向相反; orf98 的 3' 编码区和侧翼区可能起源于叶绿体丙氨酸 tRNA 基因的内含子; orf239 终止码后 10 bp 处为重复 Y, 含 cob 基因的 3' 编码区^[29], atpA, orf209 和 pvs 共转录形成 CMS 特异转录本。免疫组织化学研究表明, orf239 编码 -27 kD 的多肽, 位于花粉的胼胝质和初级细胞壁, 只在花粉的生殖组织中表达^[30]。用 pvs-orf239 转化烟草, 获得的可育转基因植株, 均无 orf239 蛋白, 而不育株均有 orf239 蛋白的表达, 为 orf239 与花粉败育的联系提供了决定性的证据^[31]。

1.5 向日葵

向日葵 CMS 胞质来源有 30 多种, 在生产上应用的仅有利用种间杂交 (*H. annuus* × *H. petiolaris*) 育成的 CMS-C 型 (PET1) 雄性不育系。比较 PET1CMS 胞质与可育胞质的 mtDNA, 发现在 CMS 系中存在 1 个由重排产生的特异区域, 该区域由 atpA 基因、cob 基因和 1 个 11 kb 的倒位、1 个 5 kb 的插入构成; 由于这一 5 kb 的插入, 导致 1 个新的 orfH522 (ORF_c) 的产生^[32,33]。orfH522 由 522 个碱基对组成, 位于 atpA 基因 3' 侧翼区域, 与 atpA 基因共转录, 合成 1 条 16 kD 的多肽。orfH522 及其 16 kD 多肽也存在于其它 9 种不同来源的向日葵 CMS 系中^[34,35]。

1.6 水稻

水稻是重要的粮食作物, 基于水稻细胞质雄性不育的杂交水稻育种已取得巨大成功, 但与矮牵牛、玉米等植物相比, 其细胞质雄性不育分子机理的研究则较为落后。根据恢保关系, 水稻的细胞质雄性不育通常分为野败型 (WA)、红莲型 (HL) 和包台型 (BT), 其分子机理的研究以 BT 型较为深入。1989 年, Kadowaki 等比较 BT 型不育系和保持系的 mtDNA, 发现 atp6 基因在不育系中存在 2 个拷贝 (保持系中只有 1 个拷贝), 其中 1 个 atp6 基因与正常胞质的完整 atp6 基因序列完全相同, 但在终止密码子下游 49 位核苷酸处开始与正常的 atp6 基因 3' 侧翼区歧化; 另 1 个 atp6 基因从 5' 端侧翼区的 -426 位核苷酸处到起始密码子下游的 +511 位核苷酸与正常的 atp6 基因相同, 但从 +512 位开始与正常的 atp6 基因完全不相同, 这个含 atp6 基因 5' 侧翼区和编码区的不明阅读框称 orf-rmc (unidentified reading frame of rice mitochondrial associated with CMS), 该区段可能与 CMS 有关^[36]。另外, 与正常胞质相同的 atp6 基因也可能与 CMS 有关。1994 年, Akagi 将 BT 型 CMS 与梗稻品种进行不对称细胞融合, 发现 CMS 杂种的 mtDNA 均在 atp6 基因终止密码子下游的第 49 位核苷酸处发生歧化, 并在第 206 位核苷酸处开始出现 1 个新的 orf79, orf79 的 5' 端和 cox I 序列高度同源; orf79 和 atp6 基因间的间隔区则与 cox II 基因上游的非编码区高度同源。Northern 分析发现, 在 CMS 系中 atp6 基因的下游均产生 atp6 基因的反义转录本, 但在恢复基因复育杂种中, 这种反义转录本的量大大降低^[37]。1995 年, Akagi 又用 12 个梗稻品种与 BT 型 CMS 系 MTC-5A 进行不对称细胞融合, 结果发现所有 CMS 体细胞杂种的 mtDNA 均含 orf79^[38], 因此 orf79 可能与 BT 型 CMS 有关。至于 WA 型和 HL 型细胞质雄性不育, 利用 RFLP 和 PCR 技术在不育系和保持系 mtDNA 之间找到了一些差异^[39,40], 但要鉴定出与 CMS 有关的 mtDNA 片段, 还要做大量的工作。

2 植物细胞质雄性不育恢复基因

植物细胞质雄性不育恢复性是细胞质雄性不育用于生产杂交种子的基础,其遗传机制一直是研究的热点。恢复性的经典遗传学研究大多集中在恢复性的基因对数、基因互作等方面。由于育性在分离世代往往既具有可分组趋势,又存在组界模糊现象,表现出“质量-数量性状”的特性,因此,对恢复性的遗传研究,常因育性指标和材料的不同而不尽一致。大多数研究表明,细胞质雄性不育恢复性受少数主基因控制;玉米 T 型、水稻 WA 型细胞质雄性不育恢复性分别与 2 对基因有关;玉米 S 型、水稻 BT 型和 HL 型、油菜 Ogura 型和 Polima 型、甜菜 Owen' 型和 H 型、菜豆的 Sprite 型以及矮牵牛的细胞质雄性不育恢复性均受 1 对育性基因控制。向日葵细胞质雄性不育恢复性的遗传比较复杂,至少需要 2 个育性恢复基因的存在^[41~42]。

植物细胞质雄性不育恢复基因的定位是近年来研究的一大热点。过去,恢复基因的定位主要采用非整倍体(单体、三体等)法和相互易位系法。利用单体分析法,提莫菲维小麦细胞质 T 型不育系的育性恢复基因 Rf_1 、 Rf_2 、 Rf_3 、 Rf_4 、 Rf_5 、 Rf_6 、 Rf_7 被分别定位于 1A、7D、1B、6B、6D、5D 和 7B,尾山羊草细胞质 C 型雄性不育的恢复基因 Rfc_1 、 Rfc_2 、 Rfc_3 被分别定位于 1C、6B 和 1D,小山羊草细胞质 U 型雄性不育的育性恢复基因 Rfu_1 、 Rfu_2 被分别定位于 1B 和 2B,变异山羊草细胞质 V 型雄性不育的恢复基因 $Rfv1$ 定位于 1BS。利用初级三体分析法,Shinjo 把水稻 BT 型细胞质雄性不育的恢复基因定位于 10 号染色体;Shinjo 和 Sato 把水稻 L 型细胞质雄性不育恢复基因 Rf_2 定位于 2 号染色体;Bharaj 等把水稻 WA 型细胞质雄性不育恢复基因 Rf_3 和 Rf_4 分别定位于 7 号和 10 号染色体^[44]。利用相互易位系法,玉米 T 型雄性不育的 2 对育性恢复基因 Rf_1 和 Rf_2 被分别定位于 3 号和 9 号染色体上;玉米 S 型雄性不育的育性恢复基因 Rf_3 被定位于 2 号染色体上;玉米 C 型雄性不育的育性恢复基因 Rf_4 被定位于 8 号染色体上^[45]。

近年来,分子标记技术得到了迅速的发展,各主要作物的分子标记连锁图谱已基本完成,分子标记定位成为当前恢复基因定位的主要方法。目前用于基因定位的分子标记主要有限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性(RAPD)、扩展片段长度多态性(AFLP)和微卫星 DNA(SSR)。利用分子标记进行基因定位有两种不同的方法,一是近等基因系分析法,用一含有目标性状的供体亲本(Donor Parent, DP)与一优良品种(轮回亲本, Recurrent Parent, RP)杂交,选择具有目标性状的后代株系与轮回亲本回交多代,最后产生的回交后代株系即为轮回亲本的近等基因系 NILs(Near Isogenic Lines);NILs 和 RP 之间的多态性分子标记很可能位于目的基因的两边近侧,然后在目的基因的分离群体中进行标记与性状的共分离分析,确定两者之间的遗传距离。该方法的缺点是构建 NILs 需连续回交多代,要耗费大量时间。二是 Michelmore 等提出的群分法(Bulked Segregation Analysis, BSA),根据目的性状将分离群体的植株分成 2 组,每组中选取一定数量的植株,将每株 DNA 在组内等量混合,形成 2 个 DNA 集团,集团之间多态性的分子标记很可能与目的基因紧密连锁;然后在 1 个更大的分离群体中进行分子标记与性状的共分离分析,确定两者之间的遗传距离^[46]。迄今,许多植物的细胞质雄性不育恢复基因已进行了分子标记定位(表 1)。

大量植物细胞质雄性不育恢复基因的定位揭示,恢复基因座可能跟抗病基因座一样,是复合的。产生这种复合性有两种主要的途径,一是决定不同细胞质雄性不育的恢复基因,以单基因的形式存在于植物等位基因座上,如 Jia 等将菜豆具不同恢复机制的 2 个恢复基因 Fr 和 Fr_2 定位于同一基因座^[48];Borner 等将小麦 P 型和 G 型细胞质雄性不育恢复基因定位于同一基因座^[46]。甜菜 H 型和 'Owen' 型细胞质雄性不育的恢复基因也可能是等位的^[43];Singh 等发现 1 个油菜基因位点影响 3 个线粒体基因的转录^[49],为这种类型恢复基因的作用机制提供了模式。另一种途径是不同细胞质雄性不育恢复基因簇集在一个区段,如水稻野败型细胞质雄性不育恢复基因 Rf_4 、BT 型细胞质雄性不育恢复基因 Rf_1 和 HL 型细胞质雄性不育恢复基因 Rf_2 位于同一区域^[55,58];黑麦中 P 型、G 型细胞质雄性不育恢复基因与恢复小麦 T 型细胞质雄性不育的恢复基因位于同一区域^[46]。

表1 用分子标记定位的植物细胞质雄性不育恢复基因

Table 1 Restorer gene of the cytoplasmic male sterility in plants which have been mapped using molecular markers

植物 Plant	基因 Gene	方法 Method	标记类型 Type of markers	染色体或连锁标记 Chromosome/Linked marker	参考文献 Reference
玉米 Maize	Rf ₁	BC ₁	RFLP	umc97	Wise <i>et al.</i> (47)
	Rf ₂	BC ₁	RFLP	umc153	
	Rf ₃	BC ₁	RFLP	whpl	Kamps <i>et al.</i> (48)
		BSA	RAPD, RFLP	OPE08 ₁₂₀₀	石永刚等 (49)
水稻 Rice	Rf ₄	BC ₁	RFLP	NPI114A	Sisco (50)
	Rf ₅		RFLP	XNpb291	Fukuta <i>et al.</i> (51)
			RFLP	fl601	Yokozeki <i>et al.</i> (52)
			SSR	OSRR1	Akagiet <i>et al.</i> (53)
	Rf ₂	NILs	RAPD, RFLP	1	Zhang <i>et al.</i> (54)
	Rf ₃ , Rf ₄	BSA	RFLP	1, 10	Yao <i>et al.</i> (55)
		QTL	RFLP	10	Tan <i>et al.</i> (56)
		QTL	RFLP	3, 4 等	李平等 (57)
		BSA	SSR	RM258	黄青阳等 (58)
	Rf ₅ (t)	F ₂	RAPD, RFLP	OPB07 ₄₄₀	Shen <i>et al.</i> (59)
					Ma <i>et al.</i> (60)
小麦 Wheat	Rf ₁	BCF ₁	RFLP	1A	
	Rf ₂	BCF ₁	RFLP	Xbcd424, Xcd442	
	Rf ₄	BCF ₁	RFLP	Xksug48	
	Rf ₃	BC ₁ F ₂	RFLP	Xcd388, Xabc156	Kojima <i>et al.</i> (41)
油菜 Rapeseed	Rf ₂	BSA	RAPD	OPC02 ₁₁₅₀ 等	Delourme <i>et al.</i> (62)
	Rfpl	NILs	RAPD, RFLP	cRF1b	Jean <i>et al.</i> (63)
矮牵牛 Petunia	Rf	BSA	RAPD, AFLP	OP704, ECCA	Bentolila <i>et al.</i> (64)
甜菜 Beta	R1H	BSA	RAPD, RFLP	PKP753	Laporte <i>et al.</i> (46)
黑麦 Rye	Rfgl	BSA	RAPD, RFLP	XS10	Borner <i>et al.</i> (65)
菜豆 Common bean	F _r	NILs, BSA	RAPD, RFLP	R335E, UBC487	He <i>et al.</i> (67)
	F _{r2}	F ₂	RAPD, RFLP	UBC487	Jia <i>et al.</i> (48)
	F _{rpt107226}	BC ₁ F ₂	RAPD, RFLP	UBC487	
	F _{rXK235}	F ₂	RAPD, RFLP	UBC190	

植物细胞质雄性不育恢复性分子机理的最终阐明,有赖于恢复基因的分离与克隆。目前对未知产物基因的克隆有两种较成熟的途径,一是转座子标签(transposons tagging),二是图位克隆(map-based cloning)。转座子标签技术是利用转座子从1个基因座位转到另1个基因座位引起的插入突变,使插入位置的基因失活并诱导产生突变型,从而检测出突变基因的位置,进而分离出目的基因。利用Mu转座子已经克隆了玉米T型细胞质雄性不育恢复基因Rf₁⁽⁵⁰⁾,该基因编码的蛋白质与哺乳类线粒体的醛脱氢酶(Aldehyde dehydrogenase, ALDHs)有60%相同,75%相似,该蛋白质有2个保守的ALDHs结构域,推测Rf₁编码类似ALDH的蛋白质,可改变由URF13介导的玉米T型细胞质线粒体的功能。图位克隆一般包括如下步骤:①确定与目标性状紧密连锁的分子标记;②以目标基因两侧最近的分子标记为起点,进行大片断基因组文库筛选;③染色体步查(Chromosome walking)获得包含目的基因的克隆;④功能互补鉴定含目的基因的克隆。利用图位克隆分离恢复基因的工作正在矮牵牛⁽⁶⁴⁾、菜豆⁽⁶⁷⁾、油菜⁽⁶³⁾等植物中实施。

3 植物细胞质雄性不育与育性恢复的机制

近年来,虽然在玉米、矮牵牛等植物中已鉴定出与CMS相关的mtDNA片段,但对于这些片段导致

细胞质雄性不育的机理知之甚少。目前主要有两种假说,一是“毒害假说”,认为CMS相关基因的产物是具有毒性的细胞毒素蛋白,这种蛋白在花药中的积累造成细胞中毒,中断花粉发育,形成雄性不育。这方面的证据来自对玉米CMS-T中CMS相关基因产物URF13的研究,用杆状病毒表达系统在昆虫细胞培养及幼虫中表达URF13,结果表明URF13对昆虫细胞有毒性甚至致死^[71]。将表达URF13的杆状病毒注入菜青虫的幼虫体内,注入后约50h便死亡,而注入不表达URF13的杆状病毒则100h后才死亡;用强启动子和urf13连接转化大肠杆菌,能导致大肠杆菌致死^[72]。此外,pol油菜的orf224和BT型水稻的urf-rmc编码的产物亦可能为毒蛋白^[72,83]。另一种观点认为,细胞质雄性不育是由mtDNA的重排导致某些基因的表达异常和功能丧失,影响呼吸链的正常电子传递,能量供应不足,导致花粉败育。在矮牵牛、玉米中,不育系抗氰呼吸途径的活力比可育系低得多^[73-75]。

对细胞质雄性不育恢复基因的作用机制也有两种解释,一是恢复基因抑制CMS特异ORF的表达,二是恢复基因补偿线粒体功能的缺陷^[5]。从现有的研究结果来看,植物细胞质雄性不育恢复基因的作用机制有如下几种:①改变mtDNA的结构,造成CMS特异ORF的缺失。菜豆细胞质雄性不育恢复基因Fr导入不育系后,其F₁为半不育,同时其mtDNA丢失pvs区段^[25]。②阻止或抑制CMS特异ORF的转录。菜豆细胞质雄性不育恢复基因Fr₂使花药中CMS特异转录本的量下降2.6倍,是CMS-Sprite的38%^[76]。在CMS-S型玉米中,恢复基因Rf₁使与不育有关的R区域转录的1.6kb mRNA的丰度减少^[77]。③改变CMS特异ORF转录本的加工和编辑。在T型玉米细胞质雄性不育系中,引入恢复基因Rf₁后,增加1.6和0.6kb 2个转录本,同时ORF13蛋白减少80%^[78,79];引入恢复基因Rf₂后,增加1.42和0.42kb转录本;引入Rf^{*}后则增加1.4和0.4kb两个转录本^[80]。在高粱IS1112C(A3)中,恢复基因改变CMS相关的orf107转录本的加工,所有部分或完全恢复的后代都具有增强的转录本加工活动(transcript processing activity, TPA);加工导致1110nt, 870nt和810nt转录本的剪切,同时380nt转录本的丰度明显增加,进一步研究表明TPA与1个同源性恢复有关的单个基因共分离^[81,82]。尤其引人注意的是,T型CMS玉米和CMS高粱的转录本加工位点具有保守的序列特征5'-CNACNNU-3'^[83],而油菜中的识别序列为5'-UUGUUG-3'^[89]。在Polima油菜中,恢复基因Rfpl使不育系增加1.3kb和1.4kb 2个转录本,而且这种改变在杂交后代和恢复基因Rfpl共分离^[89]。在BT型水稻中,引入恢复基因后,urf-rmc的转录本由2.7kb变成2.8kb^[93],B-atp6基因的转录本则由2.0kb加工成1.5kb和0.45kb 2个转录本,进一步研究发现,B-atp6的2.0kb转录本没有进行RNA编辑或只被部分编辑,而被加工的RNA转录本已全部进行编辑^[83]。④抑制mRNA的翻译。在油菜CMS-Ogura胞质中,核恢复基因复育的杂种转录本没有改变,但蛋白质的丰度大大降低^[85]。在向日葵中,CMS-C型向日葵不育系比保持系多合成1条16kD多肽,核恢复基因复育的杂种与不育系的转录模式相同,核恢复基因也不影响RNA的编辑,在黄化苗中,16kD多肽的表达不受核恢复基因的影响,但在复育杂种的花药中,16kD多肽的量大为减少^[86]。

4 结束语

近年来,植物细胞质雄性不育的研究在细胞质雄性不育相关基因位点的鉴定、细胞质雄性不育恢复基因的遗传与定位等方面均取得了很大进展,目前这方面的研究正方兴未艾。植物正常的花粉发育需要经历一系列的生理生化过程,其中任何关键环节发生功能障碍都可能导致不育。从现有的研究结果来看,细胞质雄性不育基因具有多样性,其恢复的机制也不尽相同。未来的研究将集中于CMS相关位点引起雄性不育的机制,CMS特异ORF蛋白在花药发育过程中的作用,恢复基因的克隆、结构、功能以及在分子水平上如何相互作用等。

参 考 文 献

- Clark E M, Izhar S, Hanson M R. Independent segregation of the plastid genome and cytoplasmic male sterility in *Petunia* somatic hybrids. *Mol Gen Genet*, 1985, **199**:440~445
- Kadowaki K, Ishige T, Suzuki S *et al*. Difference in the characteristic of mitochondrial DNA between a normal and male sterile cytoplasm of japonica rice. *Jpn J Breed*, 1986, **36**:333~339
- 刘炎生, 汪训明, 王耀珠等. 水稻细胞质雄性不育系和保持系的线粒体 CO I、CO II 基因组织结构差异的分析. 遗传学报, 1988, **15**(5):348~354
- 赵世民, 刘作昌, 詹庆才等. WA 型、BT 型和 D 型水稻雄性不育系细胞质基因组翻译产物分析和研究. 遗传学报, 1994, **21**(5):393~397
- Hanson M R. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu Rev Genet*, 1991, **25**:461~486
- Dewey R E, Levings J C S, Timothy D H. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell*, 1986, **44**:439~449
- Dewey R E, Timothy D H, Levings J C S. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**:5374~5378
- Wise R P, Fliss A E, Pring D R *et al*. orf13-T of T cytoplasm maize mitochondria encodes a 13 kD polypeptide. *Plant Mol Biol*, 1987, **9**:121~126
- Wise R P, Pring D R, Genyenbach B G. Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**:2858~2862
- Boeshore M L, Lifshits I, Hanson M R *et al*. Novel composition of mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids derived from cytoplasmic male sterile and fertile plants. *Mol Gen Genet*, 1983, **190**:459~467
- Boeshore M L, Hanson M R, Izhar S. A variant mitochondrial DNA arrangement specific to *Petunia* sterile somatic hybrids. *Plant Mol Biol*, 1985, **4**:125~132
- Clark E, Gafni Y, Izhar S. Loss of CMS-specific mitochondrial DNA arrangement in fertile segregants of *Petunia* hybrids. *Plant Mol Biol*, 1988, **4**:125~132
- Young E G, Hanson M R. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell*, 1987, **50**:41~49
- Nivison H T, Hanson M R. Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in *Petunia*. *Plant Cell*, 1989, **1**:1121~1130
- Nivison H T, Suttton C A, Wilson R K *et al*. Sequencing processing and localization of the *Petunia* cms-associated mitochondrial protein. *Plant J*, 1994, **5**:613~623
- Rasmussen J, Hanson M R. A NADH dehydrogenase subunit gene is cotranscribed with the abnormal *Petunia* mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility. *Mol Gen Genet*, 1989, **215**:332~336
- Pruitt K D, Hanson M R. Transcription of the *Petunia* mitochondrial CMS-associated pcf locus in male sterile and fertility-restored lines. *Mol Gen Genet*, 1991, **227**:348~355
- Bonhomme S, Budar F, Ferault M *et al*. A 2.5 kb NcoI fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male sterility on *Brassica* cybrids. *Curr Genet*, 1991, **19**:121~127
- Bonhomme S, Budar F, Lancelin D *et al*. Sequence and transcript analysis of the Nco 2.5 Ogura specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. *Mol Gen Genet*, 1992, **235**:340~348
- Grelon M, Budar F, Bonhomme S *et al*. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS) associated orf 138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* cybrids. *Mol Gen Genet*, 1994, **243**:540~547
- Singh M, Brown G G. Characterization of expression of a mitochondrial gene region associated with the *Brassica* "polima" CMS: developmental influences. *Curr Genet*, 1993, **24**:316~322
- Singh M, Brown G G. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear gene alters expression of a novel mitochondrial gene region. *Plant Cell*, 1991, **3**:1349~1362
- Wang H M, Ketela T, Keller W A *et al*. Genetic correlation of the orf 224/atp6 gene region with Polima CMS in *Brassica* somatic hybrids. *Plant Mol Biol*, 1995, **27**(4):801~807
- Handa H, Nakajima K. Different organization and altered transcription of the mitochondrial atp6 gene in the male-sterile cytoplasm of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Curr Genet*, 1992, **21**(3):153~159
- L'Hormme Y, Stahl R S, Li X Q *et al*. *Brassica nap* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mt DNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS-associated orf 224 gene. *Curr Genet*, 1997, **31**(4):325~335
- Mackenzie S, Chase C D. Fertility restoration is associated with loss of a portion of the mitochondrial genome on cytoplasmic male-sterile common bean. *Plant Cell*, 1990, **2**:905~912
- Mackenzie S, Pring D, Bassett M *et al*. Mitochondrial DNA rearrangement associated with fertility restoration and reversion to fertility in cytoplasmic male sterile *Phaseolus vulgaris* L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**:2714~2717
- Johns L, Lu M, Lyznik A *et al*. A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in

- cytoplasmic male sterile bean plants. *Plant Cell*, 1992, **4**: 435~449
- 29 Chase C D, Ortega V M. Organization of ATPA coding and 3' flanking sequences associated with cytoplasmic male sterility in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr Genet*, 1992, **22**: 147~153
- 30 Abad A R, Mehrtens B J, Mackenzie S A. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *Plant Cell*, 1995, **7**: 271~285
- 31 He S, Abad A R, Gelvin S B. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 11 763~11 768
- 32 Kohler R K, Horn R, Lossel A *et al.* Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol Gen Genet*, 1991, **227**: 369~376
- 33 Laver H K, Reynolds S J, Moneger F *et al.* Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J*, 1991, **1**: 185~193
- 34 Horn R, Kohler R K, Zetsche K. A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Mol Biol*, 1991, **17**: 29~36
- 35 Horn R, Hustedt J E G, Horstmeier A *et al.* The CMS-associated 16 kDa protein encoded by *orf H522* in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasms of sunflower. *Plant Mol Biol*, 1996, **30**(3): 523~538
- 36 Kadowaki K, Harada K. Differential organization of mitochondrial genes in rice with normal and male sterile cytoplasm. *Jpn J Breed*, 1989, **30**: 179~186
- 37 Akagi H, Sakamoto M, Shinjo C *et al.* A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Theor Appl Genet*, 1994, **25**: 52~58
- 38 Akagi H, Nakamura A, Sawada R *et al.* Genetic diagnosis of cytoplasmic male sterile hybrid plants of rice. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 948~951
- 39 许仁林, 谢东, 师素云等. 水稻线粒体 DNA 雄性不育有关特异片段的克隆及序列分析. 植物学报, 1995, **37**(7): 501~506
- 40 许仁林, 姜晓红, 师素云等. 水稻野败型细胞质雄性不育系和其保持系蛋白质多肽的比较研究. 遗传学报, 1992, **19**(5): 446~452
- 41 Crouzillat D, Canal L, Perrault A *et al.* Cytoplasmic male sterility in sunflower: Comparison of molecular biology and genetic studies. *Plant Mol Biol*, 1991, **16**: 415~426
- 42 Miller J F. Inheritance of restoration of *Helianthus petiolaris* sp. *fallax* (PEF1) cytoplasmic male sterility. *Crop Sci*, 1996, **36**: 83~86
- 43 李静, 王萍, 胡汉桥等. 向日葵 CMS 育性恢复的研究. 遗传学报, 1998, **25**(3): 265~270
- 44 Bharaj T S, Virmani S S, Khush G S. Chromosomal location of fertility restoring genes for wild abortive cytoplasmic male sterility using primary trisomics in rice. *Euphytica*, 1995, **83**: 169~173
- 45 Laughnan J R, Gabay-Loughnan S. Cytoplasmic male sterility in maize. *Ann Rev Genet*, 1983, **17**: 27~48
- 46 Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 9 828~9 832
- 47 Wise R P, Schnable P S. Mapping complementary genes in maize: positioning the *rf1* and *rf2* nuclear fertility restorer loci of Texas(T) cytoplasm relative of RFLP and visible markers. *Theor Appl Genet*, 1994, **88**: 785~795
- 48 Kamps T L, Chase C D. RFLP mapping of the maize gametophytic restorer-of-fertility locus (*rf3*) and aberrant pollen transmission of the nonrestoring *rf3* allele. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 525~531
- 49 石永刚, 郑用琰, 李建生等. 玉米 S 组 CMS 育性恢复基因的分子标记定位. 作物学报, 1997, **23**(1): 1~6
- 50 Sisco P H. Duplications complicate genetic mapping of *Rf1*, a restorer gene for cms-C cytoplasmic male sterility in Corn. *Crop Sci*, 1991, **31**: 1 263~1 266
- 51 Fukuta Y, Yano M, Fukui K. Linkage analysis of the restorer gene (*Rf-1*) in rice using restriction fragment length polymorphism markers. *Japan J Breed*, 1992, **42**(Suppl. 1): 164~165
- 52 Yokozeki Y, Nakamura A, Inagaki A *et al.* DNA markers of a fertility restoration gene *Rf-1* in rice, *Oryza sativa* L. *Breeding Science*, 1996, **46**(Suppl. 1): 73
- 53 Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A *et al.* A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, *Rf-1*, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome*, 1996, **39**: 1 205~1 209
- 54 Zhang G, Bharaj T S, Lu Y *et al.* Mapping of the *Rf-3* nuclear fertility-restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. *Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 27~33
- 55 Yao F Y, Xu C G, Yu S B *et al.* Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild-abortion cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 1997, **98**: 183~187
- 56 Tan X L, Vanavichit A, Amornsilpa S *et al.* Genetic analysis of rice CMS-WA fertility restoration based on QTL mapping. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 994~999
- 57 李平, 周开达, 陈英等. 利用分子标记定位水稻野败型核质互作雄性不育恢复基因. 遗传学报, 1996, **23**(5): 357~362
- 58 黄青阳, 何予卿, 景润春等. 利用微卫星标记定位水稻红莲型细胞质雄性不育恢复基因. 科学通报, 1999, (印刷中)
- 59 Shen Y W, Guan Z Q, Lu J *et al.* Linkage analysis of a fertility restoring mutant generated from CMS rice. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 261~266

- 60 Ma Z Q, Sorrells M E. Genetic analysis of fertility restoration in wheat using restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci*, 1995, **35**: 1 137~1 143
- 61 Kojima T, Tsujimoto H, Ogiwara Y. High-resolution RFLP mapping of the fertility restoration (Rf3) gene against *Triticum timopheevi* cytoplasm located on chromosome 1BS of common wheat. *Genes Genetic Systems*, 1997, **72**(6): 353~359
- 62 Delourme R, Bouchereau A, Hubert N *et al.* Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the Ogura radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 1994, **88**: 741~748
- 63 Jean M, Brown G G, Landry B S. Genetic mapping of nuclear fertility restorer genes for the Polima cytoplasmic male sterility in canola (*Brassica napus* L.) using DNA markers. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 321~328
- 64 Bentolila S, Zethof J, Gerats T *et al.* Locating the petunia Rf gene on a 650-kb DNA fragment. *Theor Appl Genet*, 1998, **96**: 980~988
- 65 Laporte V, Merdinoglu D, Saumitou-Laprade P *et al.* Identification and mapping of RAPD and RFLP markers linked to a fertility restorer gene for a new source of cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Theor Appl Genet*, 1998, **96**: 989~996
- 66 Borner A, Korzun V, Polley A *et al.* Genetics and molecular mapping of a male fertility restoration locus (Rf1) in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 99~102
- 67 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. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 1 056~1 062
- 68 Jia M, He S, Vanhoosen W *et al.* Nuclear fertility restorer genes map to the same linkage group in cytoplasmic male-sterile bean. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 205~210
- 69 Singh M, Hamel N, Menassa R *et al.* Nuclear genes associated with a single *Brassica* CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. *Genetics*, 1996, **143**: 505~516
- 70 Cui X, Wise R P, Schnable P S. The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science*, 1996, **272**: 1 334~1 336
- 71 Korth K L, Levings C S. Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 3 388~3 392
- 72 Levings C S. Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *Plant Cell*, 1993, **5**: 1 285~1 290
- 73 Connett M, Hanson M R. Differential mitochondrial electron transport through the cyanide-sensitive cyanide-insensitive pathways in isonuclear lines of cytoplasmic male sterile, male fertile and restored *Petunia*. *Plant Physiol*, 1990, **93**: 1 634~1 640
- 74 Musgrave M E, Antanovics J, Siedow J N. Is male sterility in plants related to lack of cyanide-resistant respiration in tissues? *Plant Sci*, 1986, **44**: 7~11
- 75 夏涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育性与组织抗氰呼吸关系的研究. *中国农业科学*, 1988, **21**(5): 39~43
- 76 Chase C D. Expression of CMS-unique and flanking mitochondrial DNA sequences in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr Genet*, 1994, **25**: 245~251
- 77 Zabala G, Gabay-Laughnan S, Laughnan J R. The nuclear gene Rf3 affects the expression of the mitochondrial chimeric sequence R implicated in S-type male sterility in maize. *Genetics*, 1997, **147**: 847~860
- 78 Kennell J C, Wise R P, Pring D R. Influence of nuclear background on transcription of a maize mitochondrial region associated with Texas male sterile cytoplasm. *Mol Gen Genet*, 1987, **210**: 399~406
- 79 Wise R P, Dill C L, Schnable P S. Mutator-induced mutations of the rf1 nuclear fertility restorer of T-cytoplasm maize alter the accumulation of the T-urf13 mitochondrial transcripts. *Genetics*, 1996, **143**: 1 383~1 394
- 80 Dill C L, Wise R P, Schnable P S. Rf8 and Rf⁺ mediate unique T-urf13-transcript accumulation, revealing a conserved motif associated with RNA processing and restoration of pollen fertility in T-cytoplasm maize. *Genetics*, 1997, **143**: 1 367~1 379
- 81 Tang H V, Pring D R, Chaw L C. Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male sterile sorghum. *Plant J*, 1996, **10**: 123~133
- 82 Tang H V, Chang R, Pring D R. Cosegregation of single gene associated with fertility restoration and transcript processing of sorghum mitochondrial orf107 and urf209. *Genetics*, 1998, **150**: 383~391
- 83 Kadowaki K, Suzuki T, Kazama S. A Chimeric gene containing the 5' portion of atp6 is associated with cytoplasmic male sterility of rice. *Mol Gen Genet*, 1990, **224**: 10~16
- 84 Iwahashi M, Kyozuka J, Shimamoto K. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial atp6 RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J*, 1993, **12**(4): 1 437~1 446
- 85 Krishnasamy S, Makaroff C A. Ogura-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasm male sterile redish. *Plant Mol Biol*, 1994, **26**: 935~946
- 86 Moneger F, Smart C J, Leaver C J. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. *EMBO J*, 1994, **13**: 8~17