

文章编号: 1004-0374(2000)03-0105-04

# 芸薹属植物雄性不育的发育生物学研究

缪颖<sup>1</sup> 曹家树<sup>2</sup> 陈林姣<sup>1</sup>

(1 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室; 厦门大学生物学系植物细胞生理与分子生物学实验室 厦门 361005;  
2 浙江大学农学院园艺系 杭州 310029)

**摘要:** 针对雄性不育性发生的发育生物学问题, 从雄性不育发生的发育阶段调控和环境调控角度综述了芸薹属植物雄性不育发生的细胞学、生理生化以及分子生物学的研究进展, 提出从 DNA 水平和基因表达水平以及应用细胞内信号传导模型探索雄性不育发生的分子机理的思路, 并对其在分子育种中的应用作了展望。

**关键词:** 芸薹属; 雄性不育; 发育; 环境因子; 信号传导

**中图分类号:** S565.02; S630.3 **文献标识码:** A

## Studies on male sterility of *Brassica* crops in terms of developmental biology

MIAO Ying<sup>1</sup> CAO Jia-Shu<sup>2</sup> CHEN Lin-Jiao<sup>1</sup>

(1 The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology & Tumor Cell Engineering;  
Laboratory for Plant Cell & Molecular Biology, College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005;  
2 Department of Horticulture, College of Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

**Abstract:** Concerning the terms of developmental biology of male sterility, the present review described the major achievements in the study of developmental mechanism of *Brassica* crop male sterility involved in developmental stage regulation and environmental regulation. The authors evaluated the molecular biological mechanism in DNA level, transcriptional level and signal transduction model, as well as their applications in molecular breeding.

**Key words:** *Brassica*; male sterility; development; environmental factors; signal transduction

芸薹属植物是我国栽培面积最大, 产量最高的一类蔬菜与油料作物, 在我国蔬菜和油料生产和供应中占有极其重要的地位, 芸薹属作物也是杂种优势利用最为普遍的一类作物, 其雄性不育系的选育及其应用基础的研究深受人们重视。本文在综述前人研究的基础上, 对芸薹属作物雄性不育的发育生物学研究思路进行探索。

### 1 雄性不育的遗传变异

20 世纪 60 年代, 在白菜型油菜 (*Brassica campestris*) 褐色沙逊和黄色沙逊中发现了由隐性单基因控制的细胞核雄性不育, 70 年代通过  $\gamma$  射线处理正在生长的甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 植株, 得到了隐性单基因控制的雄性不育突变体<sup>[1]</sup>。随后在甘蓝型油菜中发现自发的核不育株, 其不育性似乎由两对基因控制。已获得的十字花科植物的

核不育材料多数是隐性单基因, 少数为显性核控制的<sup>[2]</sup>, 认为是通过可育基因的自发突变而产生的。核质互作型雄性不育性是核不育基因与胞质不育基因互作的结果。推测是由于细胞核中的基因组和细胞质中的某种细胞器缺乏雄性可育所必需的遗传信息所造成的。而胞质雄性不育性似乎仅与线粒体或叶绿体 DNA 的重排、插入、缺失有关。

### 2 雄性不育的发育调控

雄性不育性作为一个性状, 其实现是极其复杂的, 它涉及育性基因在一定时空上的表达, 以及体

收稿日期: 1999-06-28; 修回日期: 1999-09-06

基金项目: 国家自然科学基金和中国博士后科学基金资助项目

作者简介: 缪颖 (1965~), 女, 博士, 副教授。

\* 联系人

内外因子对这种表达的影响和调控等因素。因此, 雄性不育性发生既受到发育阶段调控, 也受到环境因子的调控。

**2.1 雄性不育发生的发育阶段调控** 植物雄性不育的表型性状表现为花粉花药的败育, 芸薹属蔬菜雄性不育系的花粉和花药发育的细胞形态学研究, 前人已做了大量工作, 小孢子的败育时期随植物种类和雄性不育基因的不同而有所差异, 白菜型油菜核雄性不育系花粉的败育发生在花粉母细胞的减数分裂期<sup>[3]</sup>, 大白菜核雄性不育系花粉的败育在四分体时期之前就已开始, 花粉母细胞排列松散<sup>[4]</sup>; 胞质雄性不育系中, 早期研究表明花粉败育可发生在小孢子发育的每一个时期, 但以四分体和小孢子液泡化期间为最多<sup>[5]</sup>。甘蓝型油菜胞质雄性不育系的花粉败育发生在减数分裂期<sup>[5]</sup>, 萝卜 *ogu* 细胞质雄性不育源的小孢子败育发生在四分体期<sup>[6]</sup>。败育的小孢子母细胞细胞质液泡化, 核结构破坏, 核仁、染色体与细胞质凝集成团, 内质网呈同心圆状堆叠, 叶绿体基粒片层减少, 结构破坏, 细胞骨架不完整<sup>[3,7]</sup>。最近几年研究表明, *pol* CMS 不结球白菜<sup>[7]</sup>、*pol* CMS 甘蓝型油菜<sup>[8]</sup>和结球白菜<sup>[9,10]</sup>花药发育受阻于孢原细胞分化期, 没有孢原细胞的分化, 不形成药室。这给不育机理的研究带来了困难, 要更深入地揭示花药败育的细胞学机理, 还必须从花药发育的更早期开始, 对孢原细胞的发生进行分子水平的详细研究。

植物的育性是由基因控制的一系列生理过程、生化反应、形态构建的最终结果。50年代起对植物雄性不育的生理生化机制的研究, 揭示了雄性不育性表达与实现过程中在酶系统、物质代谢系统以及植物激素系统上所产生的变化。几种同工酶的研究表明, 大白菜核不育系在开花后不育株过氧化物酶同工酶活性明显高于可育株, 且酶带多而色深, 而细胞色素氧化酶同工酶活性和蛋白质种类则相反<sup>[11,12]</sup>, 甘蓝型油菜胞质不育系与保持系的酯酶、过氧化物酶同工酶的差异仅表现在花蕾发育期, 且过氧化物酶同工酶在花粉败育前谱带增多, 败育后酶带减少<sup>[13,14]</sup>。大白菜两用系不育株与可育株花蕾中还原糖、氨基酸、蛋白质含量及呼吸强度的变化存在着一定的趋势, 表现为不育株低于可育株<sup>[11]</sup>。在油菜核质互作雄性不育系中发现碳水化合物和蛋白质合成降低, 花药组织缺少肌动蛋白的合成, 且核酸含量显著降低<sup>[14]</sup>, 花药花粉的败育过程伴随着植物内源激素的变化, 榨菜

胞质不育系雄蕾在大花蕾和盛开花期 IAA 和 ABA 严重亏损<sup>[15]</sup>。

从发育分子生物学角度看, 花粉和花药的败育是雄性不育发生的表型体现。花粉花药特异基因的启动子和花粉发育过程中关键酶基因的表达与否, 都与花粉和花药的败育、雄性不育性的发生直接相关。植物中已经有近两百个花药和花粉特异基因被克隆。芸薹属蔬菜花药花粉特异基因及其产物的分离分析以甘蓝型油菜作物研究较多<sup>[16]</sup>。从芸薹属蔬菜中克隆与雄性不育相关的花粉花药特异表达的基因就有 6 种, 其中 I3、E2、#17 基因在前有丝分裂间期表达, 可能与花粉壁蛋白合成有关<sup>[17,18]</sup>, BP4 和 *Bnml* 基因则在有丝分裂后期表达<sup>[19,20]</sup>, BA4 和 *Bcp1* 基因在绒毡层细胞中表达<sup>[21,22]</sup>。这些花药花粉特异基因的分离与功能分析促进了核基因引起雄性不育分子机理的研究, 但不育性发生的启动和调控仍然是个谜, 对于芸薹属蔬菜细胞质雄性不育性分子生物学的研究只局限于正常品系和不育品系在细胞器基因组和转录产物的比较上, 已从细胞质不育系植株中分离和克隆了一些特异片段或基因, 如 *atp6*<sup>[23,24]</sup>和 *orf224*<sup>[25,26]</sup>, 对恢复基因如 *Rf(n)* 进行鉴别<sup>[27]</sup>, 但对它们编码的 RNA 或蛋白质的功能还不了解。

**2.2 雄性不育发生的环境调控** 雄性育性的表现受到环境条件的调控, 在不同的环境条件下, 雄性育性会发生转换。据 Kaul 统计, 70% 的雄性不育对环境敏感, 其中 CMS 敏感类型比例 (3:1) 高于 GMS 敏感类型比例 (2.3:1), 温度敏感型 (50%) 明显多于光周期敏感类型 (13%)<sup>[28]</sup>。对芸薹属蔬菜的环境敏感型雄性不育以温敏感型为主。早在 1970 年 Dickson 证明温敏感雄性不育青花菜是由一对隐性基因 MS6 控制的, 此基因的表达受控于温度。一般情况下, 低温使育性恢复, 高温导致不育<sup>[29]</sup>。生理生化研究表明, 温度诱导育性恢复是通过激素的变化介导的<sup>[30]</sup>, 低温使 GA<sub>3</sub> 增加, 花药和花粉发育正常, 而高温和 IAA 导致花药败育<sup>[31,32]</sup>。花药发育过程中内源 ABA 含量受低温调节<sup>[33,34]</sup>。Singh 应用番茄雄性不育突变体 SI2 研究表明, 育性表达与 ABA、IAA 和 GA 三种激素平衡有关, 这种平衡受到温度变化的调节<sup>[34]</sup>。而且, 在温敏感型油菜胞质不育系花粉败育过程中, 某些特异蛋白质如蛋白激酶的合成受到温度的调节, 且有 Ca<sup>2+</sup> 参与作用<sup>[36-38]</sup>。杨晓云在对温敏感型白菜 *pol* 胞质不育系的研究中提出, 温敏不育是由控制花药、花粉

正常发育的结构基因在受到温度诱导后表达与否而表现的<sup>[36]</sup>。因此,从环境信号到内源激素变化,到一系列相关基因表达,直至靶基因(育性基因)的表达调控这个细胞内信号传导模型的研究,是环境敏感型雄性不育发育生物学的另一复杂的问题。

### 3 育性表现分子机理的探索

分子生物学理论和技术的发展,尤其是分子克隆技术、细胞器 DNA 技术的改进,已深入到从植物基因水平上探讨发育生物学的问题。80 年代以来,花粉和花药发育过程中特异表达基因的克隆和部分基因的功能分析以及从线粒体和叶绿体 DNA 入手对胞质育性基因进行研究,取得了一定的成果,但对育性表现的分子机理还远未了解,如育性基因的确切定位、结构功能、如何启动表达、顺序表达和调控,以及环境因子如何通过胞内信号传递而影响育性基因的表达等问题。因此,这些问题的解决对了解育性转换规律及其本质,推动雄性不育的成功应用有重要意义,同时对发育生物学理论,如发育过程中细胞信号传导问题也将作出重大贡献。

**3.1 雄性不育基因组 DNA 水平的差异** 在系统发育过程中一个物种控制育性的基因位点可能很多,但一个核不育材料多为一对基因控制的。已知别的作物,如小麦、番茄、玉米和水稻等在不同染色体上

都存在控制育性的基因位点,每个位点的突变或缺失都能引起雄性不育。Arats 等在拟南芥菜中通过转座子插入法,获得核雄性不育株,并分离测得一个核不育基因 MS2 的序列结构<sup>[39]</sup>。我们对白菜核雄性不育两用系的 RAPD-PCR 分析也证实了不育系与保持系中存在 DNA 多态性的差异,并分离得到此差异片段可能为一调控序列,与 Bp4 的启动子序列部分同源<sup>[40]</sup>。王晓武等也从甘蓝的显性不育材料中获得不育基因连锁的 RAPD 标记<sup>[41]</sup>,对不同细胞质如 pol 和 nap 来源胞质不育的各种材料的研究结果均表明,胞质不育与 mtDNA 的突变、重排、插入和缺失有关<sup>[43,44]</sup>。油菜、榨菜和萝卜胞质不育系与保持系 mtDNA 表现出很多多态性,胞质不育 mtDNA 的突变经常产生能表达的嵌合可读框 orf 如 orf224/*atp6* 等<sup>[23-26]</sup>。核质互作型雄性不育性是核不育基因与胞质不育基因互作的结果。这是由于细胞核中的基因组和细胞质中的某种细胞器缺乏雄性可育所必需的遗传信息所造成的<sup>[45]</sup>。而胞质雄性不育性似乎认为仅与线粒体或叶绿体 DNA 的重排、插入、缺失有关<sup>[46-49]</sup>。因此,进一步对雄性不育基因的分离鉴别以及结构功能分析,将揭示雄性不育发育的本质。

表 1 核不育基因在染色体上的分布

| 植物名称 | 核不育基因 |     | 携带核不育基因的染色体数目 | 连锁群数目 |
|------|-------|-----|---------------|-------|
|      | 已知的   | 定位的 |               |       |
| 大麦   | 18    | 15  | 7             | 7     |
| 番茄   | 55    | 25  | 8             | 12    |
| 豌豆   | 38    | 10  | 5             | 7     |
| 玉米   | 60    | 33  | 10            | 10    |

**3.2 雄性不育基因的表达调控** 雄性不育性作为一个性状,其实现是极其复杂的,它涉及育性基因在一定时空上的表达,以及体内外因子对这种表达的影响和调控等因素。

雄性不育主要表现是花药不能产生有活力的花粉粒,而花粉的发育是在花药中完成。在花药发育过程中约有 2.5 万个不同基因表达,其中约有 1 万个是花药特异表达的基因。多数花药特异基因的表达具有严格的时空顺序,在花药的不同发育时期,一些基因启动表达,而另一些基因关闭;一些基因只在绒毡层细胞中表达,而另一些基因可在花药所有组织中表达。花粉发育需要一整套完整的特异表达的基因,花粉发育所需基因一旦发生突变无疑有损于花粉正常发育乃至雄性不育。如前所述芸薹属

蔬菜中已经有近几个花药和花粉特异基因被克隆,并进行序列分析和产物功能分析,有些已通过转基因在模式植物,如拟南芥菜和烟草等中进行发育生物学的研究<sup>[50-52]</sup>。而与芸薹属植物胞质雄性不育有关的线粒体基因 *atp6*,在胞质雄性不育系中存在不同 *atp6* 转录本,其结构分析表明, *atp6* 基因的上游产生一个嵌合的开放阅读框架即 orf224 或 orf105,与 *atp6* 基因共转录,产生双顺反子的转录本,抑制 *atp6* 基因的翻译水平,引起雄性不育。同时,胞质雄性不育油菜的 *atp6* 基因编码区的上游 91bp 处存在核苷酸差异,引起 *atp6* mRNA 核糖体结合位点发生改变,而使翻译不正常。此外,线粒体和叶绿体基因组中广泛存在的 RNA 编辑,是胞质雄性不育的另一种可能机制。从分析特异

表达的 mRNA 入手或利用特异蛋白的氨基酸顺序鉴定, 克隆与育性有关的特异表达基因以及这些特异表达基因的调节基因及其相关酶的基因, 结合转基因和原位杂交的分子细胞学技术, 直接在芸薹属蔬菜作物中开展雄性不育基因的个体发育生物学研究, 将成为解决育性表现调控机理的关键课题。

**3.3 雄性不育基因的环境调控** 根据童哲等对光敏感核不育 (农垦 58S) 水稻的发育生物学研究进行评述时提出的光周期调节育性的多因子作用模型<sup>[52]</sup>、环境因子对芸薹属蔬菜雄性不育材料花药花粉发育的影响通过细胞内信号传导网络传递的。根和叶片在接受逆境信号 (如高温、长光照) 后, 体内激素 (如细胞激动素、GA、IAA 等) 和光敏色素浓度发生改变, 同时影响一些信号系统, 如  $Ca^{2+}$ -

CaM 或蛋白激酶等级联放大系统, 并将此细胞信号通过茎维管束传递到花药, 由此启动雄蕊败育的进程。而在胞内分子信号水平的传导即可归纳如图 1。近十年来植物细胞信号传导热点问题的研究初步确定了细胞内信号传导网络模式, 即环境信号—细胞感受、胞内信号传递—信号肽—一系列基因表达—靶基因的表达<sup>[53]</sup>。育性基因的表达受环境因子调节, 环境因子通过内源激素或某些信号系统, 如  $Ca^{2+}$ -CaM 或蛋白激酶等级联放大系统, 与育性相关基因的表达、育性表现育性转换联结在一起。对这一信号传导网络分子成员及其相互关系的研究, 将揭示环境敏感型雄性不育育性转换的分子机理及其调控机制。

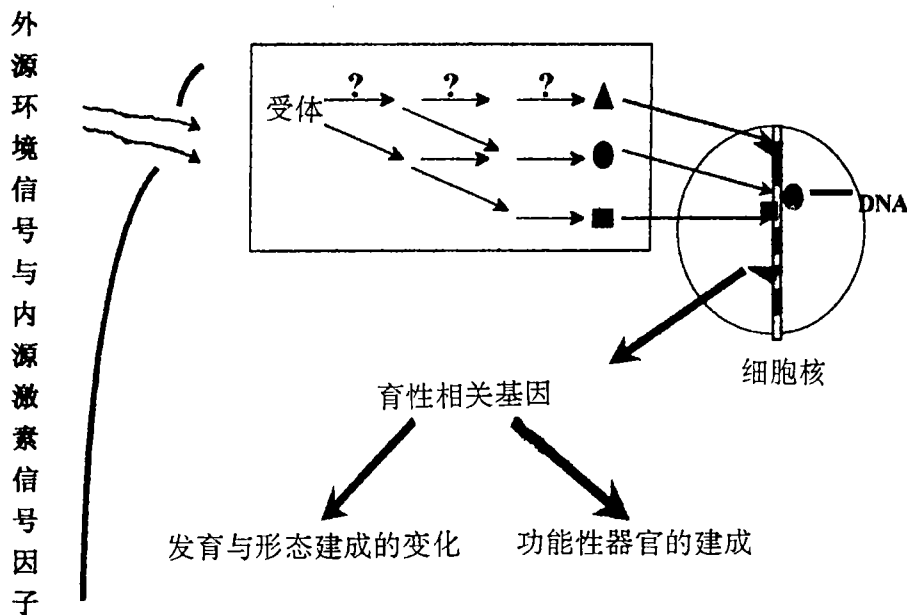


图 1 植物发育过程的信息传导机制

#### 4 展望

雄性不育性的表现是极其复杂的, 它涉及育性基因在一定时空上的表达以及体内外因子对这种表达的影响和调控等因素。目前的研究虽取得一定进展, 但尚不足以建立起对雄性不育性现象理解的总体框架, 人为控制育性表现还有一定难度。但是, 随着分子生物学理论和技术的发展与完善, 可望在以下几个方面有所突破。

**4.1 尽早分离和克隆雄性不育基因。** 无论利用 DDRT-PCR 技术, 从分析特异表达 mRNA 入手, 还是利用特异蛋白的氨基酸序列鉴定来克隆与育性有关的特异表达基因, 或者利用 RFLP 等分子标记技术结合构建大片段基因组文库进行染色体行走克隆不育基因, 其工作都成为解决育性调控机理的

关键课题。在此基础上才能更准确地确定该基因表达调控的规律和表达产物蛋白质的结构与功能。

**4.2 利用细胞信号传导网络模型,** 在完整而又简单的生命活体环境—细胞内和细胞间, 开展环境敏感型雄性不育现象中的育性转换、育性基因表达的环境调控问题的研究, 缩短分子水平的研究与实际应用的距离, 为从根本上调控育性表现提供理论基础。

**4.3 利用发育分子生物学的研究成果,** 创造工程雄性不育系。如通过将花粉和花药发育过程一些特异表达基因的启动子与能阻断花粉发育的细胞毒素基因 (RNase T1 与 Barnase 基因)、胼胝质酶基因相

(下转第 104 页)

二磷酸 (PI(3,5)P<sub>2</sub>)。PI(3,5)P<sub>2</sub> 的积累只能发生在具有 *VPS34* 基因的酵母细胞中,表明 PI3K 所产生的 PI3P 是合成 PI(3,5)P<sub>2</sub> 的必需原料,即其合成途径为 PI→PI3P→PI(3,5)P<sub>2</sub>。酵母细胞中,PI(3,5)P<sub>2</sub> 的合成可能有利于高尔基体向液泡的蛋白运输 (protein trafficking),这可能与细胞适应渗透胁迫有关 [22]。

植物体内也存在 PI3P 和 PI(3,5)P<sub>2</sub>, 还有 PI4P、PI(3,4)P<sub>2</sub> 等。虽然它们的合成途径尚未清楚,但它们也参与胞内信号转导,有证据表明,它们有别于 PLC 和 PLD 这些水解酶调节的信号系统 [21]。表达反义 *AtVPS34* 的拟南芥植株长势弱,多数植株会死亡 [20], 表明 PI3K 及其代谢产物在植物生长发育过程中十分重要。

## 5 结 语

目前,对磷脂代谢的研究主要从两方面开展:

(1) 磷脂水解酶和磷脂激酶的分子克隆和特征鉴定; (2) 对上述两类酶及其代谢产物的生理作用的研究,特别是其在信号转导中的作用的研究。但是与之相关的信号传递链的头绪远未理清。一方面是由于膜上磷脂代谢途径的复杂性,另一方面是由于胞内信号途径的多样性。今后除了对尚未深入研究的酶,如 PLA<sub>1</sub>、PLA<sub>2</sub>、PLB 及磷脂激酶进行研究外,对已克隆和鉴定的酶需作横向比较研究,如 PLD $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  同种型表达是否与不同的组织、细胞或生长阶段有关? 同种型是否位于细胞的不同

部位,受不同的上游因子调控,转导不同的环境信号? 等等。而对磷脂信号系统和其他信号系统相互或交叉影响 (cross talking) 的研究,有利于进一步阐明胞内信号转导的机理。

## 参 考 文 献

- 1 杨福愉, 黄 芬. 膜脂-蛋白质相互作用及其在医学和农业上的应用 [M]. 济南: 山东科学出版社, 1996: 1-17
- 2 李宗鑫, 周 燮. 植物激素及其免疫检测技术 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996: 225-239
- 3 Pappan K, Zheng S, Wang X. *J Biol Chem*, 1997; **272**(11): 7048-7054
- 4 Wang X. *Trends in Plant Science*, 1997; **2**(7): 261-266
- 5 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 74-76
- 6 Qin W, Pappan K, Wang X. *J Biol Chem*, 1997; **272**(45): 28267-28273
- 7 Kopka J, Pical C, Gray J E, et al. *Plant Physiol*, 1998; **116**: 239-250
- 8 Wang X. Phospholipase[A]. In: Moore TS eds. *Lipid metabolism in plants*[C]. New York: CRC Press, 1993:505-525
- 9 Ryu S B, Karlsson B H, Ozgen M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; **94**: 12717-12721
- 10 Lee Y, Choi Y B, Suh S, et al. *Plant Physiol*, 1996; **110**: 987-996
- 11-22 略
- 2 陈凤祥, 周立人, 李 展. 安徽农业大学学报, 1997; **24**(1): 45-49
- 3 Zuberi S, Ahmad A, Zuberi M I. *Phytomorphology*, 1988; **38**(2,3): 219-221
- 4 孙日飞, 吴飞燕, 司马钢等. 园艺学报, 1995; **22**(2): 153-156
- 5 Grant I, Beversdorf W D, Peterson R I. *Can J Bot*, 1968; **64**: 1055-1065
- 6 Ogura H. *Mem Fac Agric Kagoshima Univ*, 1968; **6**: 39-78
- 7 杨晓云, 曹寿椿. 南京农业大学学报, 1997; **20**(3): 36-43
- 8 余凤群, 傅廷栋. 武汉植物学研究, 1990; **8**(3): 209-216
- 9 梁 燕, 王 鸣. 西北农业大学学报, 1994; **22**(3): 19-23
- 10 柯桂兰, 宋胭脂, 张鲁刚. 西北农业学报, 1996; **5**(2): 3-9
- 11-54 略
- 1 傅廷栋. 中国油料, 1983; **4**: 79-85

## 参 考 文 献

1 傅廷栋. 中国油料, 1983; 4: 79-85