

“十一五”国家科技支撑计划
国家甜菜产业技术体系建设

项目资助

单胚甜菜细胞质

雄性不育研究及利用

王华忠 著



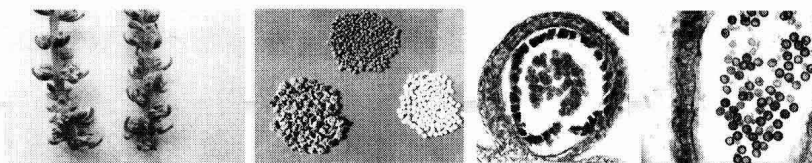
303.2

“十一五”国家科技支撑计划
国家甜菜产业技术体系建设

项目资助

DANOEITAI TIANCAI XIBAOZHI XIONGXING BUYU
YANLIU JIQI YINGYONG

单胚甜菜细胞质雄性不育 研究及利用



王华忠 著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

单胚甜菜细胞质雄性不育研究及利用/王华忠著. —北京: 中国农业出版社, 2009. 11
ISBN 978-7-109-14166-7

I. 单… II. 王… III. 甜菜—细胞质雄性不育—研究
IV. S566.303.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 192708 号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)
(邮政编码 100125)
责任编辑 黄向阳 林珠英

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2009 年 11 月第 1 版 2009 年 11 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 9
字数: 240 千字 印数: 1~1 000 册
定价: 30.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)



作者简历



王华忠 男，1957 年生于辽宁西丰。研究员，博士，博士生导师，所长助理，国家甜菜现代产业技术体系研发中心育种研究室主任，中国作物学会甜菜协会常务理事，国家糖料作物改良中心育种研究室主任，中国农业科学院第六届学位评定委员会作物科学组委员。1982 年 1 月毕业于沈阳农业大学农学专业，同年分配到中国农业科学院甜菜研究所，2003 年合并于黑龙江大学，27 年始终从事甜菜多倍体品种和单胚雄性不育品种的选育研究。2004—2007 年在中国农业科学院研究生院攻读农学博士（导师方智远院士）。被评为 1999 年中国农业科学院跨世纪学科带头人，2003 年中国农业科学院第一批

岗位带头人才，2001 年国务院政府特殊津贴专家，2002 年度哈尔滨市劳动模范，2008 年黑龙江省优秀中青年专家。主持参加国家与省部级科研及开发项目 30 余项，现担任国家甜菜产业技术体系项目的杂种优势育种岗位专家，以及主持“十一五”国家科技支撑计划和省部级在研科研项目 6 项。曾担任国家“九五”科技攻关甜菜育种材料与与方法研究专题主持人，“十五”国家“863”计划糖料新品种选育项目甜菜新品种选育课题主持人。获国家科技进步奖 2 项，省部级科研成果奖 6 项，其中甜菜多倍体品种甜研 302 育成与推广（第四名），1992 年获农业部科技进步二等奖，1995 年获国家科技进步三等奖。甜菜多倍体品种甜研 303 与甜研 304 育成与推广（第三名），1998 年获农业部科技进步一等奖，1999 年获国家科技进步三等奖。改良甜菜单胚雄性不育系与保持系的同步换核技术（第一名），1998 年获省农业科技进步二等奖，1999 年获黑龙江省科技进步三等奖。甜菜种质资源繁种编目与主要经济性状鉴定，1998 年获黑龙江省科技进步三等奖。丰产兼抗丛根病型甜菜新品种甜研 309 的育成推广（第一名），2005 年获中国农业科学院科技成果奖一等奖，2006 年获黑龙江省政府科技进步三等奖。发表论文 70 余篇，撰写专著 2 部。作为主要完成者育成甜菜新品种 9 个，其中多倍体新品种 6 个，雄性不育单胚品种 3 个。在甜菜品种育成、技术研发和推广方面有重大突破和贡献，并获得显著经济效益和社会效益。先后出国学习考察 4 次，1988 年作为访问学者在日本北海道农业试验场甜菜研究所合作研究一年，主要从事甜菜多倍体与单胚不育系选育技术研修。1996 年作为高级访问学者在日本北海道大学农学部合作研究半年，进行甜菜同工酶及生物技术育种研究。1999 年到英国布鲁姆斯甜菜试验站和意大利洛维哥甜菜所考察学习 2 周。2008 年到埃及参加发展中国家甜菜生产科研国际会议。已经培养硕士研究生 5 名，下一步研究生培养目标是甜菜分子育种。

.....

本书内容新颖，是面向从事甜菜育种、科研、生产工作者的一部新著，可以作为大专院校和科研单位甜菜育种工作者以及攻读博士、硕士学位的研究生参考之用。

方智远

[illegible]

本书共分为七章。第一章绪论，主要综述了国内外甜菜雄性不育的研究概况，我国单胚甜菜雄性不育的研究和利用现状；第二章单胚甜菜不育系及其保持系的形态学与细胞学观察，通过光学显微镜观察，对甜菜单胚不育系与保持系进行生物学和形态学比较；第三章单胚甜菜不育系及其保持系的超微结构观察，利用电子显微镜技术，对甜菜不育系和保持系的雄蕊和雌蕊进行了详细观察，如小孢子母细胞的变化，绒毡层的发育过程，乌氏体颗粒产生与否，胼胝质壁发达程度等等。雌蕊解剖结构比较，发现子房壁中含有结晶，蜜腺的分泌细胞有大量淀粉颗粒，存在极少的双胚珠现象等；第四章单胚甜菜不育的生理生化特性研究，主要研究了甜菜细胞质雄性不育与内源激素含量关系；第五章利用分子标记技术分析甜菜单胚不育系和保持系等遗传基础，采用 SRAP 和 SSR 两种分子标记方法相结合，对单胚不育系及保持系等 49 份材料进行遗传多样性分析；第六章提高甜菜单胚不育系的丰产性和抗病性选育技术研究，在病地和非病地环境胁迫下进行基因型与环境互作效应选择法以及轮回选择法同步应用，使群体丰产性与抗病性得到同步提高；第

七章利用改良的单胚不育系成功选育出3个甜菜单胚品种，对其选育过程以及产质量表现进行了详细介绍。

本书是著者主持的“十一五”国家科技支撑计划甜菜育种课题的部分研究成果，也是著者攻读中国农业科学院研究生院博士学位的主要研究内容，经过某些内容的修改和充实，比较系统地论述了单胚甜菜雄性不育的细胞学及生理生化的遗传变化，以及高产抗病甜菜单胚不育系的选育和创新技术。

在本书研究内容确定与研究过程中，始终得到我国著名蔬菜育种专家方智远院士的热情关怀和支持；在显微镜观察和分析方面，得到东北农业大学桂明珠教授、王学东副教授的悉心指导；在生理生化分析方面，得到中国农业大学王宝民教授的大力支持，在此表示衷心感谢。

本书在编写过程中，由于研究资料有限，加之编者水平有限，难免存在不妥之处，恳请读者批评指正。

著 者

2009年10月

.....
 □□□

第一章 绪论 1

0	引言	1
1	植物雄性不育性的研究进展	1
1.1	植物雄性不育的研究简史	1
1.2	植物雄性不育的类型	2
1.3	植物雄性不育的遗传机制	3
1.4	植物雄性不育的生理生化因素	9
2	甜菜作物的雄性不育性研究概况	12
2.1	CMS是甜菜育种目前唯一的不育源	12
2.2	甜菜CMS的遗传机制研究	13
2.3	甜菜雄性不育株的形态表现	15
2.4	甜菜线粒体基因组的研究	16
2.5	甜菜新型雄性不育性发掘和利用	17
3	我国单胚甜菜雄性不育的研究利用现状与展望	19
3.1	我国加速推广甜菜单胚品种的必要性	19
3.2	我国甜菜单胚雄性不育品种选育与利用进展	19
3.3	我国甜菜单胚品种推广存在问题与攻关目标	20
4	本研究的目的和意义	21

第二章 单胚甜菜 CMS 系及其 O 型系形态学与细胞学研究 22

0	引言	22
1	材料与方法	23
1.1	试验材料	23
1.2	试验方法	23
2	结果与分析	25
2.1	甜菜单胚 CMS 系及其 O 型系生殖期诸性状形态学观察	25
2.2	CMS 系及其 O 型系花药及花粉发育的细胞学同步比较	26
3	讨论	31
3.1	甜菜 CMS 的生物学和细胞形态学研究有待完善	31
3.2	甜菜单胚 CMS 的遗传机制研究尚需深入	32
4	小结	33

第三章 单胚甜菜 CMS 系及其 O 型系花的超微结构观察	34
0 引言	34
1 甜菜 CMS 系及其 O 型系小孢子发育的超微结构观察	34
1.1 材料与方法	34
1.2 观察结果	35
1.3 讨论	40
1.4 小结	46
2 单胚甜菜 CMS 系的雌蕊解剖学与超微结构观察	46
2.1 材料与方法	46
2.2 观察结果	47
2.3 讨论	57
2.4 小结	57
第四章 单胚甜菜 CMS 的某些生理生化特性研究	59
0 引言	59
1 甜菜 CMS 与内源激素的关系	60
1.1 材料与方法	60
1.2 结果与分析	61
1.3 讨论	67
1.4 小结	71
2 甜菜 CMS 与酶活性的关系	71
2.1 材料和方法	71
2.2 结果与讨论	74
2.3 讨论	77
2.4 小结	79
第五章 利用 SRAP 与 SSR 标记分析单胚甜菜 CMS 系及 O 型系的遗传基础	80
0 引言	80
1 甜菜 SRAP-PCR、SSR-PCR 反应体系的优化	80
1.1 材料与方法	81
1.2 结果与分析	83
1.3 小结	86
2 利用 SRAP 与 SSR 分子标记分析 CMS 系及 O 型系的遗传基础	87
2.1 材料与方法	87
2.2 结果与分析	89
2.3 讨论	94
2.4 小结	95
第六章 丰产抗病型单胚甜菜 CMS 系及 O 型系选育	97
0 引言	97

1 材料与方法	98
1.1 基础材料	98
1.2 试验方法	98
2 结果与分析	102
2.1 两对不同类型单胚 CMS 系及 O 型系 BC_1F_0 - BC_1F_2 的改良效果	102
2.2 单胚 CMS 系及 O 型系的轮回改良群体产质量鉴定	102
2.3 轮回改良的单胚 CMS 系测交组合产质量测定	103
3 讨论	104
3.1 单胚 CMS 系及 O 型系的同步改良	104
3.2 单胚 CMS 系及 O 型系的基因型与环境互作效应及轮回选择	105
4 小结	106
第七章 甜菜雄性不育单胚品种的选育	107
1 我国选育推广甜菜单胚品种的重要意义	107
2 单胚雄性不育三倍体甜菜品种——甜单 302 的选育	108
2.1 选育经过	108
2.2 试验结果	109
2.3 品种特征特性	111
2.4 栽培技术要点	111
2.5 适宜种植地区	111
2.6 品种制种技术	111
3 单胚雄性不育二倍体甜菜品种——甜单 304 的选育	111
3.1 TB207 组合配制与选育经过	112
3.2 杂交组合产质量鉴定结果	112
3.3 品种特征特性	114
3.4 栽培技术要点	114
3.5 适宜种植地区	114
3.6 品种制种技术	114
4 单胚雄性不育三倍体甜菜品种——甜单 305 的选育	114
4.1 组合配制与选育经过	115
4.2 产质量鉴定结果	115
4.3 品种特征特性	117
4.4 栽培技术要点	117
4.5 适宜种植地区	117
4.6 品种制种技术	117
5 甜菜单胚品种选育推广存在的问题及对策	118
5.1 单胚甜菜品种选育急需种质资源创新与育种技术改进	118
5.2 机械化水平低, 影响单胚品种推广速度	118
5.3 我国甜菜生产上外国品种占主导, 存在巨大隐患	119
5.4 甜菜种子发芽率高、根型好是育种选择的重要目标	119
5.5 我国制糖企业应该抓紧实施甜菜按质论价的收购政策	120

英文缩略表	121
参考文献	122
致谢	131

绪 论

0 引言

植物雄性不育是农作物杂种优势利用的基础。杂种优势的发现和利用，是 20 世纪植物育种的最突出成就。在杂种优势育种工作中，利用雄性不育系配制杂交种已成为一代杂种种子生产的最有效途径。由于杂种一代的广泛应用，使作物在产量、品质和抗逆性方面有了很大的突破和提高。目前，在杂交育种中更多的是利用细胞质雄性不育性，选用雄性不育系作母本，恢复系作父本，源源不断地生产出优良的一代杂交种子，在农业生产上发挥了重要作用。细胞质雄性不育（CMS）是粮、棉、油、糖等作物杂种优势利用最多的不育源，是研究核质互作等生物学基本问题很好的性状。CMS 又是遗传学中的一个重要方面，对它深入研究将有助于阐明遗传学中重大理论问题。杂交品种的利用，对于解决 21 世纪的世界性粮食问题，改善全球范围产生的环境污染，发展可持续性农业，尤其是减少农药和化肥的使用，依靠生物体内自有的特性，确保其丰产性等，将起到重要作用。

近 20 年来，在世界范围内对植物雄性不育的研究日益广泛深入。尽管在细胞质雄性不育分子机理的研究方面取得了不少进展，达成了许多共识，但从整体上看，目前的研究结果尚难清楚对雄性不育现象全面的理解，特别是对胞质育性基因的确切定位、序列结构和核质基因产物的作用等，还缺乏有说服力的验证。植物在长期进化中形成了协调的核质关系，在通过核置换形成新的核质关系时，因细胞质基因和核基因不协调而导致细胞质雄性不育。由于植物线粒体基础研究相对落后，特别是其非孟德尔遗传的特点，很难分析线粒体基因控制性状与线粒体基因的关系以及遗传的规律。因此，对于植物雄性不育的研究方兴未艾，任重道远。细胞质雄性不育的机理和利用研究在生产实践和基础理论研究中具有重要意义。

1 植物雄性不育性的研究进展

1.1 植物雄性不育的研究简史

高等植物的雌雄性别早在 1694 年由 Camerarius 发现，在 1763 年 Kolreuter 观察到了花粉败育现象。19 世纪，Gater (1844)、Herbert (1847) 和 Darwin (1890) 分别报道了 Caryophyllaceae、Rricaceae 和百合科植物的雄性不育现象。Darwin (1893) 认为，这种

不育性对于雌雄异株的进化具有一定的作用，它表现了有性生殖种内完全异花受精的适应性。Bateson 等 (1908) 对甜豌豆雄性不育的研究结果表明，雄性不育性不是一个简单的偶然事件，而是一个遗传控制系统，由单隐性基因控制。Salaman (1910) 发现了单显性基因控制的雄性不育马铃薯。1921 年 Bateson 及 Gairdner, 1927 年 Chittenden 都在亚麻上揭示了现在的细胞质雄性不育性 (CMS) 来自细胞质因子与核基因的相互作用这一遗传模式。CMS 在育种上的应用，是 1944 年由 Jones 和 Davis 的研究开始的。他们首先发现了洋葱的雄性不育株 Italian Red13-53，以其为母本，通过回交，将雄性不育细胞质赋予了品种 Crystal Wax，并且也查明了 CMS 的细胞质与核基因相互作用的遗传机制。以此为契机，CMS 被广泛用于玉米、高粱、棉花、甜菜、烟草、大麦、小麦、水稻、油菜、大豆、甘薯、胡萝卜、南瓜、甘蓝、辣椒、洋葱和亚麻等作物的杂交种种子生产，相关的遗传研究也活跃起来。Duvick (1966) 推测，所有植物种都至少有 1 个核雄性不育基因，很多种存在多个不育基因，如在大麦中超过 25 个 (Foster et al., 1983)。据统计 (Kaul, 1988)，已在 617 个种和种间杂种发现可遗传的雄性不育性，它分布于 43 科、162 属、320 个种。其中，细胞核雄性不育性发生于 216 个种和 17 个种间杂种，CMS 发生于 20 科、50 属、200 个种 (Williams et al., 1992)。

1.2 植物雄性不育的类型

植物雄性不育 (malesterility) 是指由于生理上或遗传上的原因，造成植物不能产生或释放有功能的花粉，但是雌蕊仍能接受外来花粉受精进行正常发育的现象。

根据雄性不育形成原因，CMS 可以分成异源细胞质雄性不育 (ACMS) 和同源细胞质雄性不育 (HCMS) 两种类型，然而在遗传及细胞质结构上并无本质的区别。把同一种内发现的 CMS 称为同质细胞质雄性不育，而由异种细胞质与栽培种的核组合形成的 CMS 称为异质细胞质雄性不育 (CMS)，与 CMS 相对，由细胞核基因单独控制的雄性不育性称之为核基因型雄性不育 (GMS)。希尔斯 (Sears, 1947) 则把植物雄性不育划分为三种不同结构的类型 (三型说)：细胞质型、细胞核型和质核互作型。多数学者认为，CMS 只是暂时没有发现细胞核恢复基因的核质互作雄性不育。因此，把雄性不育划分为细胞核雄性不育和核质互作雄性不育两种类型，细胞核雄性不育简称核不育 (Genie Male sterility, GMS 或 Nuclear Male Sterility, NMS)，核质互作雄性不育简称细胞质不育 (Cytoplasmic Male Sterility, CMS)。CMS 是高等植物中广泛存在的一种现象，它受细胞质基因和细胞核基因的双重控制，是一种不能产生有活力花粉的母性遗传性状。

1.2.1 细胞核型雄性不育

细胞核型雄性不育由核基因控制，其不育性不受细胞质类型影响，因此，这种类型的雄性不育性的遗传和表达完全遵循孟德尔遗传规律，简称核不育。在细胞核雄性不育中，根据其不育基因显隐性的不同，可以将其分成显性细胞核雄性不育 (DGMS) 和隐性细胞核雄性不育 (RGMS) 两个亚类。在显性细胞核雄性不育中，根据其不育基因的数目不同，分成单显性细胞核雄性不育 (MDGMS) 和双显性基因互作 (显性上位) 细胞核雄性不育 (DDGMS)。在隐性细胞核雄性不育中，根据其不育基因的数目不同，可以将其分成单隐性基因细胞核雄性不育 (MGMS)、双隐性基因细胞核雄性不育 (DRGMS) 和多

隐性基因细胞核雄性不育 (PRGMS)。

在 216 个种和 17 个种间杂种发现的细胞核雄性不育中, 隐性核不育占 88%, 而显性核不育仅占约 10%。细胞核雄性不育系的多数都是单隐性基因控制, 利用同系分离的可育株对不育株授粉保持时, 后代只能出现 50% 的不育株。虽然解决了亲本繁殖难和多代自交生活力下降的难题, 但是在生产杂种时需拔除母本行 50% 的可育株, 增加了育苗成本。另外, 如可育株拔除不彻底, 使杂交率降低, 种子质量得不到保证。对于显性核不育系, 李树林等 (1988) 在甘蓝型油菜、张书芳等 (1990) 在大白菜中都找到了保持系, 获得了 100% 不育群体。方智远等 (1995) 选育成功甘蓝 100% 显性雄性不育系, 已经配制出了优良的一代杂交种在生产上利用。核内隐性基因控制的雄性不育材料一般只有恢复系, 它和正常可育材料的杂交后代为可育, 在其 F_2 代育性发生分离, 并符合 3:1 的分离比例。由于细胞核雄性不育无法找到 100% 的保持系, 实际应用中采用了“两用系”的方法, 经过测交选择, 选育出不育株 (msms) 和可育株 (Msms) 各占 50% 的群体, 前者相当于不育系, 后者相当于保持系 (故称“两用系”), 不育株和可育株杂交产生下一代“两用系”。显性细胞核雄性不育的主要优点是雄性不育性比较稳定。细胞核雄性不育的缺点是找不到保持系。

1.2.2 细胞质雄性不育

CMS 由一种特定的雄性不育细胞质 (S) 所控制。不育性不受细胞核基因型的影响, 因此这种雄性不育性属于母性遗传。细胞质型不育是在不育系的细胞质内有雄性不育因子 S, 在正常品系的细胞质内有正常可育因子 N, 而细胞核内没有相应的雄性不育基因和可育基因, 这种雄性不育系只有保持系, 没有恢复系。

1.2.3 质核互作型雄性不育

质核互作型雄性不育由不育细胞质 (S) 和不育细胞核基因 (Fr) 共同控制。当细胞核存在显性恢复基因 (Fr) 时, Fr 基因可以抑制不育胞质的作用而产生雄性可育。但是, 核质互作雄性不育系的利用存在下列缺点:

- (1) 不易获得恢复系, 需花费很大力量完成三系配套。
- (2) 可能存在细胞质负效应和细胞质单一化的潜在危险。
- (3) 雄性不育性的表达往往不太稳定。

一般而言, 异源 CMS 的主要优点是其雄性不育性稳定, 但缺点是可能有不良细胞质效应和恢复基因难找。而同源 CMS 的主要优点是可能没有不良细胞质效应和恢复基因容易寻找, 缺点是不育性易受环境影响。因此, 利用异源 CMS 进行植物杂种优势的主要任务是, 克服外源细胞质的不良效应和寻找恢复能力强的育性恢复基因。而利用同源 CMS 的主要问题是, 克服其雄性不育性的不稳定性。

1.3 植物雄性不育的遗传机制

植物雄性不育作为一种遗传现象, 其实现表达过程是极其复杂的, 涉及许多育性基因在一定时序上的表达, 以及体内外诸多因子对这种表达的影响和调控等因素 (Kadowaki, 1993; Song and Hedgcoth, 1994; 凌杏元等, 2000)。核质育性基因在其表达过程中也必然会引起各种水平上的广泛变异, 如生化水平、生理水平、超微水平和细胞水平等, 而不

同的雄性不育基因所引发的各个水平的变异也是不同的。自植物雄性不育性发现以来,国内外学者从遗传学、细胞学、分子生物学、生理生化等角度,对植物雄性不育机制进行了广泛深入的研究,并且已取得了一定进展。

众所周知,基因表达具有严格的时间性和空间性,雄性不育基因的特定表达也是在雄性器官分化发育过程中起作用,最终导致雄性败育。所以,造成人们所观察到的雄性不育株与可育株各种水平上的差异的根本原因,是不育基因作用的结果。如在植物雄性不育的花药败育过程中,营养物质的供应失常很可能是不育基因作用于物质代谢水平上的结果,而不能作为雄性败育的根本原因。当然,对败育过程中各个水平上的变异情况进行观察和分析,是深入认识和理解雄性不育机制的不可缺少的工作。

分子生物学研究发现,在植物雄性器官的分化发育过程中,涉及近万种特异表达的基因,人们已经发现了其中的几十种。这几十种特异基因大多数属于核基因,仅少数为胞质基因。按其表达的时期分类,一类为早期基因,一般在减数分裂后被激活;一类为晚期基因,一般在小孢子有丝分裂后表达。从中不难发现,这些特定基因的表达与花粉母细胞的减数分裂及单核花粉的有丝分裂密切相关。但目前 CMS 和线粒体基因组及核基因组的关系以及 CMS 的本质机理仍未研究清楚。

1.3.1 植物雄性不育的细胞形态

植物雄性不育的细胞学和解剖学研究,主要是确定小孢子发育受阻的时期和败育方式,从细胞形态学上探讨小孢子败育的原因。大量研究表明:小孢子败育可能发生在小孢子发育过程中的任何一个时期,包括从孢原细胞之前到成熟花粉粒时期,而败育的高峰期是四分体至小孢子单核期(Kaul, 1988; Laser, 1972)。

雄性不育性的自发产生,是细胞核基因或细胞质基因或两者互作的结果。雄性不育基因可以作用于小孢子发育的各个时期,但多数发生在减数分裂前期、前期 I、四分体、小孢子形成和释放及花粉发育阶段。从植株形态上,雄性不育性表现许多不同形式(Kaul, 1988):

- (1) 雌雄异株株系中完全没有或高度缺乏雄性个体。
- (2) 在正常两性花植株上,雄性器官不发育或畸形。
- (3) 不能发育正常的造孢组织。
- (4) 小孢子发生异常,产生不完善、无生活力、畸形或败育的花粉。
- (5) 花粉不能成熟或在亲和的柱头上不能发芽。
- (6) 形成有生活力的花粉,但花药不开裂。
- (7) 不是因为自交不亲和而导致的花粉不能到达柱头或胚珠。

在高等植物的有性繁殖和世代交替生活中,花粉代表雄性配子世代,它是由小孢子母细胞减数分裂后产生的。花粉发育是在花药中完成的。多数植物的花药具有 4 个小孢子囊,每个小孢子囊由花药室和数层花药壁组成,小孢子在花药室内产生并发育成为成熟的花粉粒。花药壁一般分为纤维层、中层和绒毡层三层。绒毡层是最内层营养细胞,营养物质必须经过绒毡层细胞才能到达药室,同时有许多营养物质是在绒毡层细胞中合成后进入药室的,对小孢子发育起重要的作用。因此,绒毡层对小孢子和花粉的发育有重要意义。花粉的发育至成熟是极其复杂的,一般可分为小孢子发生期、雄配子体形成期和花粉成熟

期三个阶段。初生造孢细胞经过多次有丝分裂产生小孢子母细胞或称花粉母细胞，在经过减数分裂形成四分体，其周围有一层厚的胼胝质。在花粉发育的过程中，绒毡层逐渐向外分泌胼胝质酶，分解胼胝质，使未成熟的 4 个小孢子互相分离，并迅速长成薄壁球形的大细胞。刚形成时，该细胞中央有 1 个大而圆的细胞核，核质比很高。随后，细胞质中的液泡逐渐由小变大，将细胞核挤压到与萌发孔相对的一侧，小孢子的外表不断沉积孢子花粉素，构成具有抵抗性的坚韧的细胞壁。小孢子然后进入第一次不对称分裂，形成两个不均等细胞，其中只含有少量细胞质的子细胞发育成生殖细胞，另一个含有丰富细胞质的子细胞则发育成营养细胞。小孢子从生殖细胞产生开始即被称为雄配子体，小孢子发育到一定阶段，生殖细胞逐渐进入营养细胞的细胞质中，营养细胞的中央液泡开始分散以至消失。大多数植物的生殖细胞停留在分裂的前期或前中期状态，成熟花粉粒只含有 2 个细胞，故称为二核花粉。这类植物的花粉直到萌发后，才在生长的花粉管中进行第二次有丝分裂，形成 2 个雄配子。而另一些植物如玉米等的花粉粒中的生殖细胞，在花粉成熟过程中就完成第二次有丝分裂，产生 2 个雄配子体，成熟花粉粒中包含 3 个细胞，故称之为三核花粉。成熟花粉粒中积累了大量的营养物质，为花粉萌发和受精奠定了雄厚的物质基础。

关于绒毡层与小孢子之间的关系，在许多雄性不育小孢子发育的细胞学研究中都发现绒毡层异常发育的现象，而且绒毡层的异常往往是最先表现的不育特征 (Laser, 1972)。Chauhan (1980) 对 GMS、CMS、IMS 三种类型的 10 种雄性不育小孢子发育的比较研究发现，雄性不育的小孢子败育与绒毡层的异常结构有关，与药膜组织的畸形变化有关。但有研究报道，有些小麦 CMS 系的花药败育过程中，绒毡层发育大多数正常，维管束组织也发育正常。总之，在花粉发育过程中，绒毡层细胞至少在以下三个方面起到重要作用：①绒毡层细胞提供了小孢子发育过程中所需的全部营养物质；②绒毡层细胞分泌四分体解离所需的胼胝质酶，而且分泌的时间性很严格，太早或太晚都会严重影响花粉的生物学活性；③产生花粉外壁的前体物质，保护花粉免受侵害。

1.3.2 植物雄性不育的花粉特异基因表达

CMS 最大的特点就是花粉发育不正常，而其他组织器官的发育均正常，因此 CMS 不太可能是线粒体某一关键基因发生变化。许多与 CMS 有关的基因往往是一些经重排产生的嵌合基因，编码的是线粒体非必需的多肽，这一附加多肽或缺陷多肽干扰了线粒体功能的正常行使，但不同组织细胞对此的耐受能力不同，与花粉发育有关的组织细胞对线粒体功能的依赖性最大，反应最敏感，因而最先造成损害 (Wallace et al., 1989)。此外，有可能在花药发育过程中产生某种特殊的物质，它们与这些附加型多肽相互作用而导致花粉发育受阻。如花药执行特殊的功能，很多物质如胞粉素等只在花药中合成 (Bedinger et al., 1992)，但分离这些花药特异物质的尝试尚未成功。

杂交动力学研究发现，在玉米、烟草和紫露草等成熟花粉粒中，大约有 2 万~3 万种不同的 mRNA，总量低于叶细胞。如果将 mRNA 按丰度分为高、中、低三级，那么在同一丰度水平上，花粉细胞中 mRNA 的拷贝数明显高于茎、叶细胞。在花粉发育过程中，有大量的基因被激活，成熟花粉中 15 % 左右的 mRNA 是小孢子发育所特有的。

1.3.3 植物雄性不育的细胞质遗传

细胞质遗传物质主要包括叶绿体基因组 (cpDNA) 和线粒体基因组 (mtDNA)。通

通过对体细胞融合杂种后代 cpDNA、mtDNA 和 RFLP 分析,证实可育及不育胞质的 cpDNA 可同时存在于不育和可育杂种后代的细胞质,由于叶绿体基因组具保守性,因而人们认为线粒体基因组可能是绝大多数 CMS 性突变的主因。

1.3.3.1 线粒体 DNA (mtDNA) 与 CMS

自从 20 世纪 60 年代初确定高等植物线粒体中存在遗传物质之后,人们对玉米、小麦、高粱、大豆等植物线粒体基因组的组织结构、大小、限制性内切酶图谱、基因定位、基因表达以及遗传特性等方面进行了大量的研究,得到了较为丰富的资料。迄今对植物不育系和保持系(包括部分恢复系及 F_1 代)之间的线粒体进行过以下层次的比较:①线粒体基因组酶切图谱;②线粒体内除其基因组之外的类似于质粒的小环状 DNA 分子;③线粒体体外翻译产物;④线粒体超微结构。

大量遗传学、细胞学和生物化学的研究表明,线粒体 DNA (mtDNA) 的某些改变与 CMS 存在一定联系 (Hanson, 1991)。由于 mtDNA 的改变涉及线粒体基因组、线粒体基因、线粒体基因转录以及线粒体蛋白等各个层面,因此各个层面均可能与 CMS 有关。

由于线粒体基因组庞大,在比较正常胞质和不育胞质线粒体基因组差异时,难以进行整基因组全序列分析。但通过比较玉米、小麦、水稻、油菜、高粱和向日葵等正常和不育胞质线粒体基因组限制性酶切物理图谱,发现两者线粒体基因组结构差异较大,两者不仅在同源序列、功能基因排列顺序和方向上有差异,且都含非同源序列。

许多学者对几种植物 CMS 的研究认为,嵌合基因可能是引起雄性不育的主基因,尽管不同植物嵌合基因各不相同,但都有类似的结构,即有功能的 5' 调控区域通过重复序列与阅读框衔接。另外,不育有关基因位点的转录表达往往有组织特异性。大多数材料不育系线粒体能合成一特异的多肽,并主要集中在小孢子发生组织中,而恢复基因则可降低其丰度。但是也有的不育系缺少某一特异多肽的合成,这表明不同材料其 CMS 机理可能不同。

Levings 和 Pring (1976) 首次发现,利用多种限制性内切酶酶切玉米正常胞质 (N) 和 (T) 型胞质的 mtDNA,发现两者的酶切图谱有明显的差异。他们的工作是对胞质雄性不育基因进行分子水平研究的开端。随后许多研究者对玉米、向日葵、牵牛、水稻、小麦、高粱、油菜、烟草、甜菜和蚕豆等植物的 RFLP 图谱作了研究,都表明 mtDNA 表现了很高的多态性程度。

许多研究者发现,不育和可育胞质线粒体质粒不同,一些不育胞质特有的质粒与 CMS 性有关,线粒体基因组具有大量的重复序列介导了基因组的重排,而重排能产生基因新的表达调控方式,甚至产生新的基因。一些与细胞质雄性不育密切相关的所谓“嵌合基因”(玉米和矮牵牛),就是基因组 DNA 重组的产物。这些突变体经常产生能够表达的嵌合可读框 orf (open read frames)。异常的线粒体以及和雄性不育有关的序列明显,是由于 DNA 的重排、插入、缺失所产生 (Dewey et al., 1986)。对玉米研究发现,一种分子量为 13 ku 的多肽 urf13 只存在于玉米 T 型 CMS 系中,而在其相应的保持系及恢复系中都不存在。该蛋白是由线粒体 DNA 中 1 个长为 3 547 bp 的片段(称为 T-urf13 基因)编码的。比较水稻不育系及其正常品系之间的线粒体 DNA 结构,也同样发现两者之间存在差异。如中国科学院遗传研究所的王斌、李大东 (1990) 等发现,水稻不育系中线粒体基因组有两个 atp 基因拷贝,而相应的保持系线粒体基因组中只有 1 个 atp 基因拷贝。