

玉米

雄性不育生物学

李竞雄 周洪生 孙荣锦 主编
中国农业出版社



国家攀登计划农业项目系列书



国家攀登计划农业项目系列书
NATIONAL CLIMBING PROGRAM AGRICULTURE PROJECT SERIES

玉米雄性不育生物学

BIOLOGY OF MALE STERILITY IN MAIZE

李竞雄 周洪生 孙荣锦 主编
EDITOR-IN-CHIEF JINGXIONG LI HONGSHENG ZHOU
AND RONGJIN SUN

中国农业出版社
CHINA AGRICULTURE PRESS

内 容 提 要

本书是国内外关于玉米雄性不育生物学的第一本专著,内容翔实、新颖,图片丰富,系统讲述了玉米雄性不育的理论与应用的基础知识,包括雄性不育的研究及应用的历史、现状,雄性不育的细胞学、超微结构、分子生物学及雄性不育的有关研究方法等。本书是研究雄性不育的科技人员的重要参考书,也可作为生物学科的研究生和大学的教学参考书。

国家攀登计划农业项目系列书

玉米雄性不育生物学

李竞雄 周洪生 孙荣楠 主编

* * *

责任编辑 范 林 舒 薇

中国农业出版社出版(北京市朝阳区农展馆北路2号 100026)

新华书店北京发行所发行 北京朝报印刷厂印刷

787mm×1092mm16开本 12.5印张 280千字

1998年6月第1版 1998年6月北京第1次印刷

印数 1~1000册 定价 52.00元

ISBN 7-109-05039-4/S·3169

(凡本版图书出现印刷、装订错误,请向出版社发行部调换)



中华农业科教基金会简介

中华农业科教基金会经中国人民银行批准,民政部注册登记,于1995年12月20日成立。基金会得到国家科委、中国人民银行、民政部、农业部等部委的大力支持;得到国内外企业界、知名人士的积极响应。基金会归口农业部管理,接受中国人民银行和民政部监督。

中华农业科教基金会的宗旨是:通过广泛吸收国内外和社会各方面的资金,用以支持中国农业科教事业,补充国家主渠道对农业科技的投入,以加快实施“科教兴农”战略。

中华农业科教基金会的任务是:发展农业科教事业,推动农业科技进步,提高农业劳动者素质,促进中国农业发展和农村经济繁荣。基金会资助农业基础研究、应用研究、试验示范、成果推广和农业科教前沿重大课题的研究;资助有突出贡献和有发展潜力的中青年农业科技人才;资助优秀农业科技著作的出版;奖励在中国农业科教事业中做出重要贡献的个人。

中华农业科教基金会将根据政府制订的农村经济发展规划,定期公布资助方向。资助项目的遴选实行“公开申请,专家评审,民主公正,择优资助”原则。基金会建立严格的筹资、管理和使用制度,公正、合理、规范、科学、有效地使用农业科教基金,向捐赠者公开收支帐目,接受监督。

中华农业科教基金会热忱欢迎国内外企业、社团、各界人士向本基金会捐赠资金,本基金会可根据捐赠者的意愿,设立名人基金、专项基金等。

主 编：李竞雄 周洪生 孙荣锦

副 主 编：付苍生 邓迎海

撰 稿 人：（以姓氏笔划为序）

邓迎海	付苍生	田志国	孙荣锦	李贵夕
陈伟程	张东方	杜德玉	季良越	周洪生
郑用琰	赵南明	郝宏京	崔 洋	赫忠友



玉米作为重要的粮食和饲料作物在世界经济的发展中起着不可估量的作用。玉米在我国作物中总产位居第二；而我国玉米面积和产量在世界仅次于美国，排名第二；玉米在解决我国粮食问题上起着十分重要的作用。

自从 20 世纪 30 年代中期开始使用杂交玉米以来，杂交玉米在世界各国的玉米生产中所占比重逐年上升。杂交玉米可以使产量大幅度地提高，但每年需要生产种子，即制种；玉米制种需要人工去雄，这是一件十分严格而辛苦的工作，操作不当还易引起种子混杂。60 年代美国大量使用 T 型细胞质雄性不育生产杂交种子，节省了大量的人力物力，提高了种子的质量。由于过分大量使用单一的细胞质，致使小斑病 T 小种在 1970 年大流行，迫使美国放弃 T 型雄性不育的利用。从此有关雄性不育的机理研究迅速增加，美国及其他国家的科学家对雄性不育进行了较系统的研究，但有关玉米雄性不育的专著在国内外还没有见到。我们从事多年玉米雄性不育的研究，在玉米雄性不育的细胞学、遗传学、分子生物学和育种利用方面做了大量的工作；又由于国家攀登计划“粮棉油雄性不育杂种优势的基础研究”项目的实施，使得我们能够深入系统地研究雄性不育的有关基础理论，发现并验证了一些新的雄性不育的现象。我们决定将我们的研究成果及前人的研究成果系统地进行总结，出版一部《玉米雄性不育生物学》专著，使得他人和后来者能够在研究雄性不育时有一本较系统的参考书，少走弯路。

本书分 5 章，第一章系统地概括了雄性不育的基础知识和玉米雄性不育类型及遗传，包括细胞质雄性不育和细胞核雄性不育；第二章讲述了玉米雄性不育的利用原理和方法，包括细胞质不育的利用、细胞核不育的利用和最新研究的热门课题——工程雄性不育的构建和应用前景；第三章是关于玉米胞质雄性不育的细胞学知识；第四章是关于玉米核不育系统的细胞学，尤其是对超微结构的研究；第五章则是方法学，较系统地讲述了研究雄性不育所涉及的方法和技

术。

第一章的作者是张东方、孙荣锦、周洪生、赫忠友、郑用琰、谭树义、田志国、杜德玉；第二章由周洪生、邓迎海、孙荣锦、李贵夕主笔；第三章的主笔是季良越、陈伟程；第四章由孙荣锦、付苍生撰稿；第五章则由崔洋、孙荣锦、付苍生、郝宏京、魏建昆、赵南明等人合作写成。

全书文字部分约 20 万字，图片近 200 幅，许多内容是近年来最新研究成果，有些内容还是第一次发表，大量的图片都是最近几年研究过程中拍摄的。相信本书对从事雄性不育的研究人员定会有所帮助。

在本书原稿交出版社后，李竞雄先生不幸与世长辞，我们怀着十分沉痛的心情谨以此书纪念李竞雄先生。

由于编著者的学识水平有限，书中不足之处在所难免，敬请有识之士批评指正。

编著者

1997 年 4 月 20 日

于北京中国农业科学院作物育种栽培研究所



前言

第一章 玉米雄性不育的类型及遗传	1
一、雄性不育概述	1
(一) 雄性不育的概念及意义	1
(二) 雄性不育的分类	2
二、细胞质雄性不育 (CMS)	3
(一) 玉米细胞质雄性不育的分类	3
(二) 恢复专效性分类的原理和方法	4
(三) 玉米细胞质雄性不育的分子生物学研究	5
(四) 玉米细胞质雄性不育恢复基因的遗传	11
(五) 玉米细胞质雄性不育育性的不稳定遗传	13
三、基因雄性不育	15
(一) 小孢子发生	15
(二) 基因雄性不育研究进展	16
(三) 基因雄性不育遗传及基因定位	19
四、玉米温敏型雄性不育性研究	20
(一) 玉米温敏型雄性不育性的发现、选育和育性测定	21
(二) 温敏核雄性不育玉米的异交、自交结实性	21
(三) 温敏核雄性不育玉米育性恢复能力	22
(四) 温敏雄性不育的应用前景及有关问题	22
五、光敏雄性不育玉米的发现及初步研究	22
(一) 光敏雄性不育玉米的发现及表现	23
(二) CA507 光敏雄性不育的初步鉴定	24
(三) 温度的作用	27
第二章 玉米雄性不育的利用	30
一、细胞质不育的利用	30
(一) 不育系、保持系的转育和选育	30
(二) 恢复系的选育	33
(三) 细胞质雄性不育化育种和利用的若干问题	38
二、核不育利用的原理和方法	40

(一) 利用细胞核雄性不育系的意义	40
(二) 利用细胞核不育性的原理、方法、问题	40
三、工程雄性不育构建及应用前景	46
(一) 工程不育系和恢复系构建的生物学基础	46
(二) 构建工程不育系、恢复系的技术路线	50
(三) 工程不育系应用前景展望	53
第三章 玉米胞质雄性不育的细胞学	55
一、花药形态	56
二、正常胞质花药发育的细胞学	56
三、T 型不育系小孢子败育的细胞学	60
四、C 型不育系小孢子败育的细胞学	62
五、S 型胞质不育系花粉败育的细胞学	65
第四章 玉米基因雄性不育的细胞学	67
一、玉米核不育基因表达特征和不育机理研究进展	67
二、玉米核不育系花药发育的超微结构	74
(一) 玉米核不育 ms ₁ 花药发育时期的超微结构	74
(二) 玉米核不育 ms ₂ 花药发育时期的超微结构	109
(三) 玉米核不育 ms ₇ 花粉发育的超微结构	124
(四) 玉米核不育 ms ₁₀ 花药发育时期的超微结构	124
(五) 玉米核不育 ms ₃₀ 花药发育的超微结构	141
第五章 雄性不育的研究方法	155
一、细胞学研究方法	155
(一) 光学显微镜方法	155
(二) 荧光显微技术	159
二、电子显微镜及其样品制备技术	161
(一) 透射电镜及样品制备技术	161
(二) 扫描电子显微镜及样品制备技术	166
三、玉米雄性不育细胞质抗逆性研究方法	169
(一) 细胞学方法	169
(二) 生物化学方法	172
(三) 毒素学方法	175
索引	180
参考文献	184

第一章 玉米雄性不育的类型及遗传

一、雄性不育概述

（一）雄性不育的概念及意义

植物在有性繁殖过程中不能产生正常的花药、花粉或雄配子的遗传现象称为雄性不育 (male sterility)。这种现象在高等植物中普遍存在。据 Kaul (1988) 报道, 已经在 43 科、162 属、320 个种的 617 个种或种间杂种中发现雄性不育。在主要农作物如玉米、水稻、小麦、高粱、油菜、棉花中都有发现。

雄性不育性在利用杂种优势中具有非常重要的作用。表现雄性不育的植株, 因其自身雄性配子败育, 而雌性器官及配子发育正常, 所以只有被授以其他植株的正常花粉才能正常受精结实。如果两个亲本杂交后产生的 F_1 植株, 从生长势、丰产性、抗逆性等方面优于双亲, 便产生了强大的杂种优势。

雄性不育使人类大规模地利用杂种优势成为可能。玉米属异花授粉作物, 天然杂交率在 90% 以上。玉米以其雌、雄同株异花的植物学特征, 于 20 世纪 30 年代初, 最早被利用人工去雄、自然授粉的技术生产了第一批商用杂交种, 成为粮食作物中杂种优势利用成功的首例。但因在配制杂交种时, 需人工去雄, 不仅增加了劳动强度, 提高了种子成本, 而且会因去雄不彻底而难以保证杂交种的质量。我国农业部小麦玉米品种质量监测中心 1994 年、1995 年连续两年对全国主要玉米生产基地配制的杂交种进行随机抽样检测的结果表明, 1994 年抽查的全部杂交种样品均达不到国家种子质量标准, 1995 年达到国标的样品数仅占 1.2%。种子不合格的主要原因是因母本去雄质量差, 杂交种子中混有相当数量的自交系, 直接影响了

杂种优势潜势的发挥。早在 50 年代, 在一些发达国家的玉米大面积集约化制种中, 开始采用雄性不育材料以免人工去雄授粉, 不仅节省了劳资投入, 更重要的是保证了杂交种质量, 较大限度地发挥了优良杂交种的增产潜力, 使不育化杂交制种技术迅速推广和普及。据统计, 到 1970 年美国不育化杂交种的种植面积占总面积的 85% 左右。我国不育化杂交种的种植面积在 1989 年已达 15.5 万 hm^2 。近年来, 随着植物雄性不育机理的深入研究, 雄性不育杂交种的利用必将成为玉米杂种优势利用中的一项主要措施。

(二) 雄性不育的分类

玉米雄性不育依其形成原因、细胞学特点及形态学特征划分为不同的类别。

通常将由于外界环境因素, 如高温、干旱、营养缺乏等引起的雄配子发育过程中生化反应受阻而形成的不可遗传的雄配子败育, 称为非遗传性不育。这种雄性不育在生产上没有利用价值。将由育性相关基因 (或核基因, 或质基因, 或质、核基因互作) 发生突变而导致雄配子发育夭折形成的雄性不育称为遗传性雄性不育。

对玉米遗传性雄性不育的分类可追溯到 20 世纪 30 年代, Rhoades (1930) 首次从来自秘鲁的原始材料中发现了雄性不育的单株。1933 年 Rhoades 又发现一些雄性不育的材料, 他的研究表明, 其中一部分材料的雄性不育性状在杂交后代难以得到保持, F_2 群体表现典型的孟德尔方式分离, 他认为这类雄性不育性状是由单纯核基因 (msms) 控制的, 而另一部分材料情况恰好相反, 杂交后代的育性难以得到恢复, 并表现非孟德尔式的母性遗传方式, 他认为这类雄性不育是单纯由细胞质不育基因控制的。为了证实这一判断, Rhoades 将 10 条染色体分别带有不同标记性状的材料去代换由质基因控制的雄性不育材料的各条染色体, 结果仍不能使其后代的育性得以恢复。

40 年代, Sears (1947) 在总结前人的发现及研究的基础上, 根据雄性不育材料基因型的差异, 提出了玉米雄性不育的“三型学说”理论。

(1) 细胞核雄性不育 (genic male sterility, GMS), 又叫基因雄性不育

这种类型的雄性不育特征仅由核基因控制, 不受细胞质的影响, 不具正、反交遗传效应。根据核基因的作用方式, 又分显性核不育与隐性核不育类型。目前已发现有 23 个隐性核不育基因 ms, 由于这种不育类型难以找到保持系, 因此必须在特定的遗传背景如易位双杂合体、具有与 ms 紧密连锁的性状标记基因等条件下才具有生产上的利用价值。

(2) 细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS)

这种类型的雄性不育性仅由一种特定的不育细胞质基因控制, 具有正、反交遗传效应, 表现典型的母性遗传特点。由于可育父本往往仅提供细胞核的遗传物质参与授精, 杂交后代仍为雄性不育, 难以找到恢复系, 因而也不具有生产上的利用价值。

(3) 核、质互作型雄性不育 (genic-cytoplasmic male sterility)

这种类型的雄性不育性由核不育基因 (rfrf) 与质不育基因 (S) 互作而共同控制。研究表明, 核、质基因组双方任何一方具有正常基因, 育性即可恢复。基因型为 S(rfrf), 表现为不育性, 称为不育系。基因型为 N(rfrf), 表现为可育性, 同时作为父本, 可使不育系材料的育性得以保持, 称为保持系。基因型为 S(RfRf), N(RfRf), 表现为可育性, 作为父本, 可使不育材料的育性得以恢复, 称为恢复系。由于这类不育材料可以通过测交鉴定找到保

持系、恢复系，因而被成功地利用在玉米杂交种的不育化制种中。周洪生（1994a）对此类雄性不育做过专门的综述（表 1-1）。

表 1-1 核质互作雄性不育的基因型及表现型

细胞质 \ 细胞核	RfRf	Rfrf	rfrf
正常型 N	N (RfRf) 可育	N (Rfrf) 可育	N (rfrf) 可育
不育型 S	S (RfRf) 可育	S (Rfrf) 可育	S (rfrf) 不育

随着科学的发展与研究的深入，不同位点的 Rf 基因不断地被发现与鉴定。人们以往认为找不到恢复系的细胞质不育材料，包括 Rhoades 当年发现并肯定为质不育的材料在内，逐渐实现了三系配套。50 年代中期，Edwarson (1956) 则将“三型学说”修改为“二型学说”，即自然界仅存在核不育型 (GMS) 和核质互作型两类。一般认为后者不育性主要由质基因引起，同时为了与核不育型相对应，现在通常称核、质互作不育型为细胞质不育型 (CMS)。

远缘核置换可产生雄性不育，根据这一现象有人提出“一型学说”，认为单纯核不育类型也是不存在的，任何正常作物细胞核和细胞质之间的生理生化代谢方式是相互协调的，由于杂合或诱变使细胞核与细胞质产生了变异，都有可能产生雄性不育。

从多年的研究来看，“二型学说”能较好地解释各种雄性不育现象，能够指导雄性不育的理论研究和生产实践，因而为大多数人所接受。

在核质互作的雄性不育类型中，由于核、质基因的互作方式和引起花粉败育的途径不同，又将其划分为配子体 (gametophytic) 雄性不育类型与孢子体 (sporophytic) 雄性不育类型。

在配子体雄性不育材料中，雄配子的败育多发生在二核花粉期，时间较迟。败育的发生受控于雄配子自身的核、质基因的互作方式，当核、质基因组双方存在任何一个可育基因，败育现象不会发生。只有当双方均带有不育基因时，雄配子体的发育才会夭折，形成空泡状的败育花粉。因此，恢复型 F_1 植株 S (Rfrf) 只产生为正常细胞质杂交种一半的可育花粉，表现为半可育状态。 F_2 群体的单株间不表现可育株与不育株的分离。

在孢子体雄性不育材料中，雄配子体的败育发生在四分体期至单核花粉期，时间较早，败育的发生受控于孢子体的核、质基因互作方式。当植株的核、质基因组双方存在任何一个可育基因时，减数分裂后产生的所有雄配子均为可育。只有当双方均带有不育基因时，往往因孢子体的绒毡层细胞发生畸变而导致配子体的发育受阻，形成仅具干瘪花药的雄花。因此，其恢复型 F_1 植株 S (Rfrf) 的花粉全部可育。 F_2 群体的单株间表现出可育株与不育株的孟德尔式的分离。

二、细胞质雄性不育 (CMS)

(一) 玉米细胞质雄性不育的分类

自 Rhoades (1930) 首次发现玉米雄性不育材料后，Хаджинов (1932) 在苏联的 Мордавия

黄硬粒地方品种中发现 M 细胞质不育材料, 1937 年在苏联又发现一些细胞质雄性不育材料, 后经美国农业部定名为 USDA。1944 年在美国 Texas 的 Mexican June 地方品种的后代“金色六月”中发现并定名为 T 细胞质雄性不育材料。近年来, 国内也相继发现了唐徐、双、Y 等雄性不育材料。据统计, 至今已有一百多种不同胞质来源的细胞质雄性不育材料。这些材料通常是以材料来源命名其细胞质类型, 例如, T 型 CMS 是以 Texas 地名而命名, 唐徐型 CMS 是选自唐四平头 $\times$ 徐 5R 单交种的后代。这种由育种者自行命名的方式记录了不育胞质的来源, 但不能反应各类不育胞质在遗传上的异同及核质基因互作的对应关系, 且同类多名现象严重。因此有必要对已发现的不育材料按科学标准统一分类、利用。

(二) 恢复专效性分类的原理和方法

植物细胞质雄性不育的遗传学及分子生物学研究表明, 某一特定的胞质不育基因所引起的线粒体代谢紊乱和功能失常, 在其相对应的核恢复基因产物的作用下, 可以得到补偿, 从而使育性得以恢复正常。这种特定胞质不育基因与相对应的核恢复基因之间发生严格的一对一的互作关系称为育性恢复专效性。依据这一原理, 利用一组具有不同恢复基因的自交系对各种胞质类型的不育系进行广泛的测交, 依其后代恢、保表现便可进行胞质不育类型的分类。这种方法已成为各类作物雄性不育胞质分类的常用方法之一 (表 1-2)。

表 1-2 若干玉米细胞质雄性不育系胞质分类

组 群	不育细胞质来源
T	T (Texas)、HA、P、Q、RS、SC、1A、7A、17A、……
S	S (USDA)、B、CA、D、E、EK、F、G、H、I、J、K、L、M、ME、ML、MY、PS、R、S、SD、TA、TC、VG、W、唐徐、双、二咸、大黄、小黄、江……
C	C (Charrua)、Bb、E、Es、PR、RB

摘自 Beckett (1971)、郑用琰 (1982)、刘纪麟 (1991)、秦泰辰 (1993)

Beckett (1971) 选用 4 个具有不同恢复基因的自交系作父本, 依据恢复专效性原理, 将 30 种不同来源的细胞质雄性不育材料的胞质划分为 T、C、S 三个基本类型。组内不同材料对测验种表现相似的育性反应。

$$\text{雄花不育品系} \times \text{Tr} \begin{cases} \text{被恢复的品系} \times \text{K55} \begin{cases} \text{被保持的品系} \cdots \cdots \text{S 组} \\ \text{被恢复的品系} \cdots \cdots \text{不详} \end{cases} \\ \text{被保持的品系} \times \text{W23} \begin{cases} \text{被恢复的品系} \cdots \cdots \text{C 组} \\ \text{被保持的品系} \cdots \cdots \text{T 组} \end{cases} \end{cases}$$

郑用琰 (1982) 研究了国内若干细胞质雄性不育系的胞质类型, 提出了一套胞质测验种, 建立了我国自己的胞质分类体系。

$$\text{雄花不育品系} \times \text{恢 313} \begin{cases} \text{被恢复的品系} \cdots \cdots \text{S 组} \\ \text{被保持的品系} \times \text{自风 1} \begin{cases} \text{被恢复的品系} \cdots \cdots \text{C 组} \\ \text{被保持的品系} \cdots \cdots \text{T 组} \end{cases} \end{cases}$$

温振民 (1983) 也对玉米细胞质雄性不育分类提出了一种方法, 他依据不同的不育胞质的特殊表型效应, 综合鉴定, 逐级分类, 具体步骤是: 首先在室内或田间鉴定不育系是否抗专化性侵染 T 型细胞质的玉米小斑病 T 小种, 确定其是否属于 T 组。其次, 在抽穗后按不育系花药、花粉败育情况初步确定属于 C 组 (孢子体雄性不育) 或 S 组 (配子体雄性

不育)。最后,用特定自交系测交,按 F_1 及其子代育性的恢保关系进行分析,最终按综合鉴定结果进行归类。这种方法较稳妥。

T组CMS材料的雄配子败育时期较早,败育彻底,属孢子体雄性不育,从1950年到1970年,是生产玉米杂交种的主要不育类型。1970年美国雄性不育杂交种的种植面积已达玉米总面积的75%~80%,其不育系类型几乎全部属于T组(Duvick et al. 1978)。雄性不育材料在杂交种生产中,带来的巨大经济效益,使人们忽视了玉米小斑病(*Helminthosporium maydis* Nisik) T小种的发现及对T型胞质的专化侵染的报道,从而导致1970年玉米小斑病的蔓延,造成美国全国范围内的玉米严重减产。Smith等(1970)经研究证实,玉米小斑病T小种能够产生对T型细胞质具有专化效应的T毒素。T毒素对T型细胞作用的初始位点是线粒体。一种杀虫剂Methomyl具有和T毒素同样的功能。目前,T组不育系已基本在生产中停止使用。

C组不育系也属孢子体雄性不育类型。对玉米小斑病T小种无专化感染。1988年魏建昆曾报道在四川雅安发现了玉米小斑病C小种的存在。但据陈伟程(1995)研究,C小种仅专化侵染C组中的CI亚组,并且CI亚组的植株对C小种的反应从高度感病到不感病,其侵染的专化性不及T小种对T型不育系的侵染。

S组属配子体不育,败育时期较晚,育性的稳定性较差且易受核背景基因型的影响,在某些核背景中不育性高度稳定而在另一些核背景下常产生一定频率的花药外露并散粉。S组不育系没有发现小斑病和其他病害的专化性侵染。S组包括了一百多种不育胞质类型,是三组胞质中最大的一组,Beckett所研究的30种不同胞质不育材料有25种属于S组。根据华中农业大学玉米研究室的多年研究,在我国的地方品种中,S型不育细胞质的出现频率较高。他们已从唐四平头×徐5R的 F_1 中发现唐徐CMS,从地方品种小籽黄和大籽黄×自交系的杂交种中筛选出小黄型和大黄型CMS,研究表明这些不育系均属于S组。

除了T、C、S三组外,还有一些不育系如EP型不育系,它具有多年生玉米(*Zea perennis*)的细胞质和普通玉米的核,遗传特性不同于T、C、S组,可能为另外的类群。对于新发现的不育系如Y型不育系等,其不育胞质的归类,有待进一步研究。

(三) 玉米细胞质雄性不育的分子生物学研究

1. 细胞质内的遗传物质 在植物细胞中,独立于核遗传系统的细胞质遗传系统主要有叶绿体和线粒体,它们有自己的遗传物质,能进行DNA复制、转录和翻译。除了李继耕(1983)等少数学者认为玉米CMS与叶绿体有关外,大量的研究结果表明玉米CMS和线粒体密切相关。

线粒体是细胞质中的具有重要功能的细胞器,一般呈杆状和粒状,约为 $0.1\sim 1.0\mu\text{m}$ 。一般在能量需求比较旺盛的细胞中数目比较多,如玉米的根冠细胞中有200~2000个,小孢子中平均高达17900个。线粒体具有双层膜结构,从外至内分别为外膜、膜间隙、内膜和基质。线粒体最主要的功能是生物氧化,通过氧化有机物质产生的NADH和 FADH_2 所携带的高能电子经过分布于线粒体内膜上的电子传递链最终被氧气接受,伴随着这个电子传递过程有ATP的生成。ATP是生物体内几乎一切需能反应的能量直接供体。

在线粒体基质中有 DNA 存在,称为 mtDNA (mitochondrial DNA)。这些 DNA 可以在线粒体内进行复制、转录和翻译,所以线粒体有自己一套完整的遗传信息贮存和表达系统。但是 mtDNA 又不足以编码自身所需的全部信息,很多在线粒体内担负有重要功能的蛋白质复合体是由核基因和线粒体 DNA 各编码一部分亚基,分别表达,最后在线粒体内组装成有活性的成分,从这一意义出发,线粒体也是半自主性的细胞器。

根据玉米 mtDNA 的粘粒 (cosmid) 基因文库的重叠克隆,推导出玉米线粒体 DNA 为单环状 DNA 分子,称为主 DNA (图 1-1)。两种正常胞质 NA、NB 的主 DNA 大小分别为 700kb 和 570kb, T 组的主 DNA 为 540kb。到 1995 年为止,已有 46 个基因被定位到主 DNA 上 (Fauron et al. 1995)。这些基因主要有:线粒体的核糖体 rRNA 基因:rrn18 (18SrRNA)、rrn26 (26SrRNA) 和 rrn5 (5SrRNA); 16 个转移 tRNA 基因; 7 个核糖体蛋白基因; 与生物氧化作用有关的基因如 NADH 脱氢酶复合体亚基基因 (nad1-7、nad9)、细胞色素 C 氧化酶亚基基因 (cox I、cox II、cox III)、ATPase 复合体亚基基因 (atp6、atp9、atpA)、cob 等; 另外还有一些功能未知的开放阅读框如 urf156、urf25 以及在 T 组中出现的 T-urf13 等。

玉米线粒体 DNA 的一个很惊人的特点是,在环状分子中具有许多重复序列,如 NA 的 mtDNA 中有 0.7、4.8、5.2、6、11、14、120kb 7 套重复序列,其中 14kb 的是反向重复,而其余的都是正向重复。在这些重复序列中,一类可引起分子内、分子间的重组事件发生,而另一类基本不涉及重组。正向重复和反向重复都可以引起重组事件,但是结果不同,正向重复序列的重组可以使 DNA 主环变为 2 个亚环分子,每个亚环各包括一个重复序列,这个过程的反向过程就是两个亚环分子通过分子间的重组形成一个主环。反向重复序列的重组事件可使重复序列间的序列发生倒位。若一个主环内有多个重复序列参与重组,则产生的亚环种类大大增加。由于线粒体内 mtDNA 分子多拷贝的特点,所以主 DNA 分子之间也可能发生分子间的重组。各种重组事件的发生均可能导致有关基因的重排与嵌合,详见图 1-2。

2. 玉米 CMS 的分子生物学基础 Levings 和 Pring (1976) 首次利用限制性内切酶消化玉米正常胞质 (N) 和 T 型胞质的线粒体 DNA (mtDNA), 然后进行琼脂糖凝胶电泳,分离不同长度的 DNA 片段,发现存在明显的差异。Pring 和 Levings (1978) 继续用该方法研究了 T、C、S、N 4 种胞质的 mtDNA 的遗传多型性,发现了各种胞质类型在带数和带型上的差异,其中 88% 的 C 胞质 mtDNA、78% 的 S 胞质 mtDNA、73% 的 T 胞质 mtDNA 与 N 胞质的相同。他们还在 7 个不同核背景的 T 型胞质不育系中发现其 mtDNA 的电泳图谱是相同的。而对玉米叶绿体 DNA (cpDNA) 的研究表明,除用 Hind III 酶切 S 胞质的 cpDNA 有一条带较其他胞质发生了微小的移位外,各种胞质的 cpDNA 酶切图谱之间无明显的差异。这些结果第一次从分子水平证明玉米雄性不育基因存在于 mtDNA 上,而与 cpDNA 无直接关系。从此,玉米 CMS 的研究集中到线粒体 DNA、线粒体质粒、线粒体蛋白质和线粒体超微结构上,将玉米 CMS 的研究推进到分子水平。

mtDNA 的差异不仅存在于各组 CMS 材料间,也存在于组内。Pring 等 (1980) 对不同胞质来源的 C、RB、BB、E 和 ES 共 5 种不同 C 组 CMS 材料的 mtDNA 进行研究。为此根据 mtDNA 的酶切图谱将 C 组玉米雄性不育胞质初步分为 C I (C)、C II (RB、BB 和 E)、C III

(ES) 三个亚组。由 Hind III 的酶切图谱表明, C I 亚组较 C II 亚组缺少一条谱带, 而 C III 较 C I 则多出一条谱带。用 Xho I 和 Sma I 也可以将三个亚组区别开来。Sisco 等 (1985) 分析

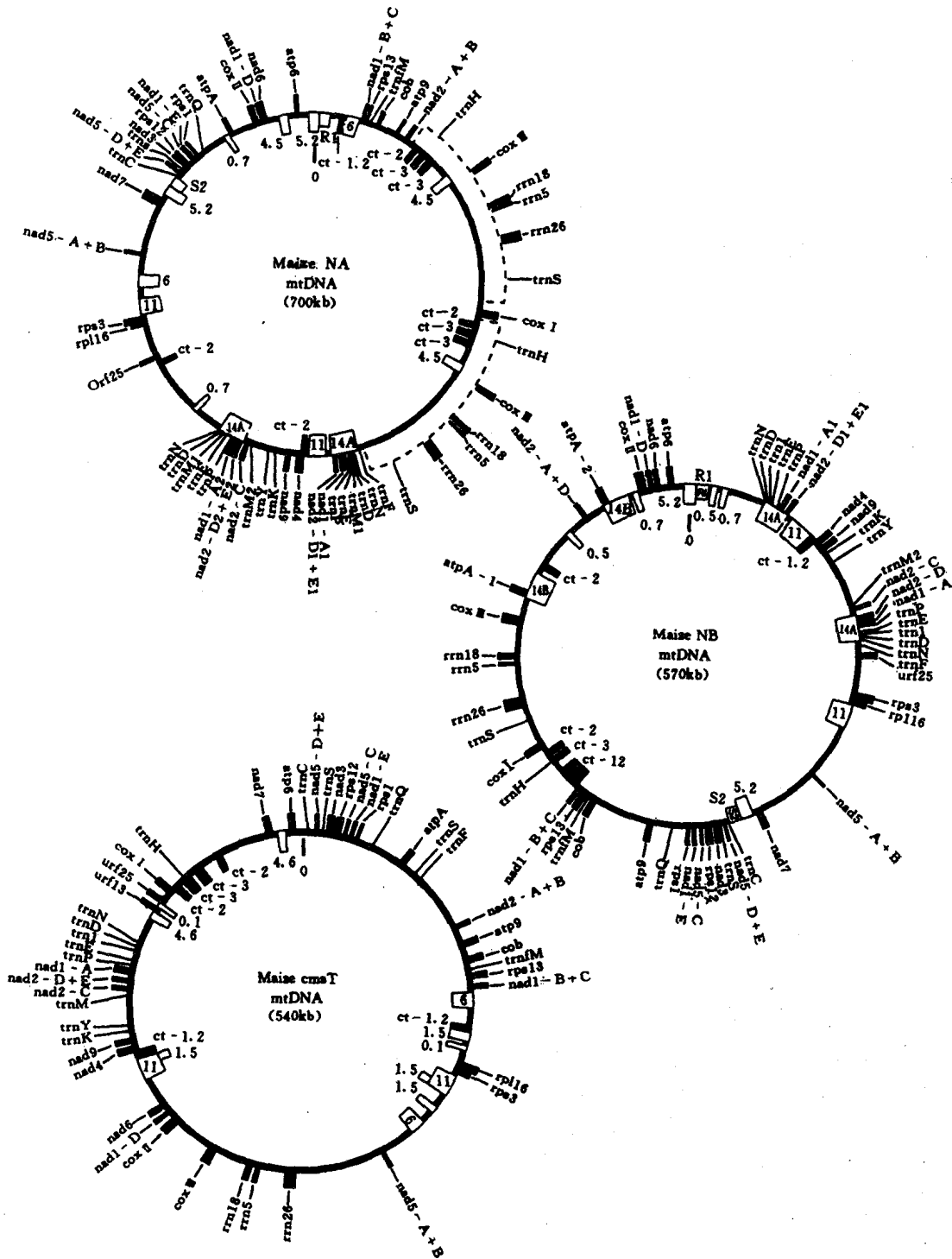


图 1-1 玉米三种线粒体主 DNA 图谱

了 25 种不同来源的 S 组材料的 mtDNA, 结合 F_1 花粉形态观察, 认为 S 组的不育胞质至少可以再分为五个亚组, 分别是 CA、B/D、LBN、ME 和 S。CA 亚组的成员最多, 供试的 25 个材料中有 18 个属于该亚组。CA、B/D 和 LBN 亚组有较为相似的 mtDNA 电泳图谱, 但是它们对部分恢复系 C092 的育性反应不尽相同。在自交系 W182BN 的核背景下, LBN 不育胞质的线粒体中出现了两条独特的双链 RNA。ME 和 S 亚组的 mtDNA 电泳图谱各有自己的特点, 与其他亚组差别较大。

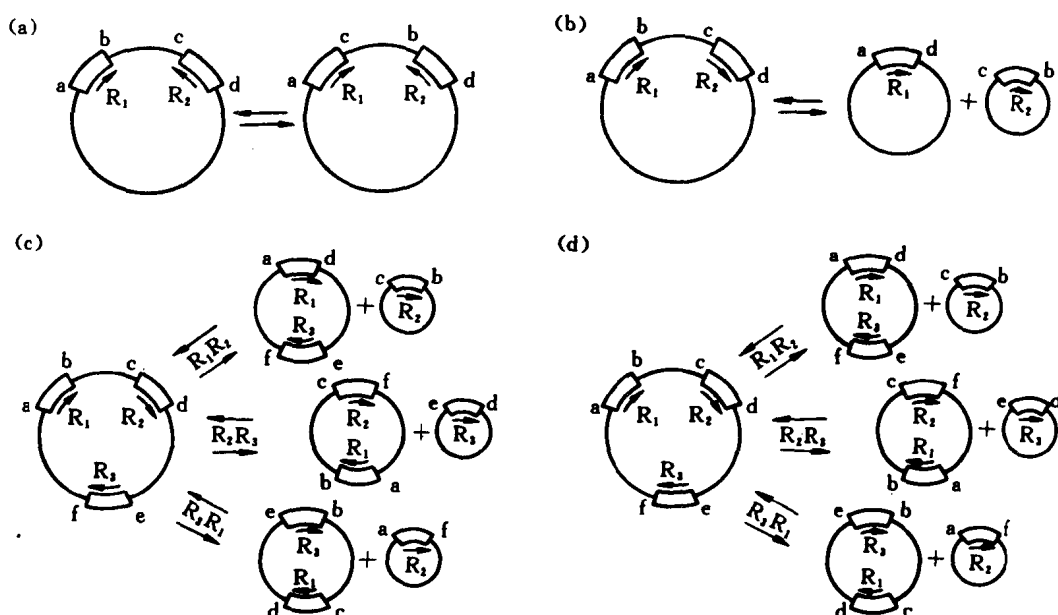


图 1-2 重复序列间重组的模式图

为了更好地利用玉米 CMS 材料, 扩大不育细胞质的遗传基础, 避免胞质类型过分单一而导致遗传脆弱的情况, 对组内材料进一步分类很有必要。但是亚组分类的分子生物学意义和遗传本质有待深入研究。

大部分遗传信息最终表现为蛋白质。Forde 等 (1980a, 1980b, 1978) 对 4 种胞质类型的玉米线粒体进行了离体蛋白质翻译的研究, 发现在 T 组线粒体中存在一个 13kd 的特异蛋白质, 称为 T-多肽, 其表达受到恢复基因的抑制, 而正常胞质线粒体合成 21kd 的特异蛋白质, C 组胞质线粒体合成 17.5kd 的特异蛋白质, S 组胞质中存在 58~84kd 的 8 条高分子量特异蛋白。

T 组不育系的愈伤组织继代繁殖多次后, 诱导分化成植株, 在后代中发现可育并抗小斑病 T 小种的突变体, 这些突变体缺乏 T 组线粒体合成的 13kd 的特征蛋白质。对 mtDNA 限制性内切酶片段分析发现, 除了一个称为 T_4 的突变体外, 其他的育性回复突变体中, 一个 6.3kb 的 Xho I 片段取代了 T 型胞质中的一个 6.6kb 的 mtDNA 片段 (Dixon et al. 1982)。Dewey 等 (1986) 分析了这个 6.6kbDNA 中称为 $TURF_2H_3$ 的一段 DNA 序列, 发现了两个开放阅读框, 即 T-ORF13, 产生 13kd 的蛋白质, 为一种内膜结合蛋白, 免疫实验证明与最初被 Forde 等 (1980b) 鉴定的 13kdT-多肽为同一基因产物。另一个开放阅读框是 T-ORF25,