

大豆雄性不育遗传及基因工程创造途径^{*}

梁慧珍¹ 李卫东¹ 许 阳² 常鸿杰³ 陈鑫伟⁴

(1. 河南省农科院棉油所, 郑州 450002; 2. 南阳市农科所, 南阳;
3. 平顶山市农科所, 平顶山 467000; 4. 商丘市农科所, 商丘 476000)

摘要 雄性不育的研究对于杂种优势的利用具有重要意义。本文综述了大豆雄性不育的遗传及利用基因工程创造大豆雄性不育的可能途径, 并对其在杂种优势利用中的应用前景进行了展望。

关键词 大豆; 基因工程; 雄性不育; 杂种优势

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2004)04-0296-05

植物雄性不育是指有性繁殖中不能产生正常的花药、花粉和雄配子。据统计, 已经涉及 43 科、162 属、320 个种的 617 个品种或种间杂种中发现了雄性不育现象^[1]。雄性不育的研究对于杂种优势的利用具有重要意义。水稻在杂种优势的利用方面取得了重大突破, 但大豆作为重要的经济作物, 杂种优势的机理及利用研究仍处在起步阶段。

杂种优势是生物界的一种普遍现象。利用杂种优势可以显著地提高作物产量, 改善作物品质, 因此杂种优势利用在农业生产中占有重要的地位。近几十年来, 杂种优势在农业生产上已取得了举世瞩目的成就, 已成为许多作物的主要育种方法^[2-4]。作物雄性不育系的选育是杂种优势利用的关键环节, 但利用常规的育种方法来选育不育系存在周期长, 见效慢, 不育基因单一, 对环境因素影响敏感等问题, 远不能满足生产发展的需要。近年来, 通过基因工程创造植物雄性不育系及其恢复系已在一些作物上获得了成功^[5-8], 为作物杂种优势的利用开创了新的前景。

1 大豆雄性不育的遗传研究进展

我国质核互作雄性不育系的选育目前在国际上是领先的, 多个单位均实现了三系配套, 并找到了一些具有强优势的组合。Palmer 等^[9]综述了杂种大豆生产与评价方面的研究进展, 中国的工作占有相

当大的比例。目前的问题是不育系异交结实性低, 不能大量繁殖和生产杂种种子。已经研究的方法是通过苜蓿切叶蜂传粉^[10]。

20 世纪初以来, 在大豆研究中陆续发现了一些雄性不育材料。后来的研究表明, 在这些先后发现的雄性不育材料中, 绝大多数属于细胞核基因控制的雄性不育性, 少数为细胞质雄性不育性, 也称细胞质-核互作雄性不育性。

1.1 细胞核型雄性不育性遗传 (genic male sterility, GMS)

细胞核雄性不育性是由细胞核不育基因控制, 差异其作用不受细胞质类型影响, 没有正反交的遗传效应。其雄性不育的遗传、表达完全符合孟德尔遗传规律, 一般由控制花粉正常育性的核基因发生突变形。在核不育材料中, 多数为隐性不育基因控制, 只有少数受控于显性基因。

隐性核不育与任何育性正常材料的杂交一代均是正常可育的, 即任何育性正常材料均是其恢复系。但找不到典型的保持系, 不能产生大量不育系种子供制种之用, 只能从 F₁ 代杂合可育株的自交后代中分离得到不育株。因此隐性核不育系兼具不育系、保持系的功用 (两用系)。单基因控制的显性核不育通常是基因突变的产物, 这种核不育材料既找不到完全的恢复系, 也找不到完全的保持系, 后代总是分离出一半不育株和一半可育株。显性核不育的遗传行为在许多方面与隐性核不育相似, 但有两个明显区

* 收稿日期: 2004-05-18

基金项目: 农业科技成果转化资金项目, 编号为: 02EFN214100376

作者简介: 梁慧珍 (1968-), 女, 副研究员, 博士生, 从事大豆遗传与分子育种研究。E-mail: LHZH66666@163.com

别:一是显性核不育测交 F_1 代出现育性分离,而隐性核不育测交 F_1 代全部可育, F_2 才出现育性分离。二是显性核不育群体中的可育株的自交后代全部正常可育,而隐性核不育则出现育性分离。

由细胞核基因控制的大豆雄性不育性材料,迄今已有多个。现已鉴定并正式命名的大豆雄性不育基因有:ms1,共有 7 个突变体,即 T260H、T266H、T267H、T268H、T287H、T290 和 L78-387;ms2,1 个突变体, T259H;ms3,3 个突变体,即 T273H、T284H 和 T291H;ms4,3 个突变体,即 T274H、T277H 和 T295H;ms5,1 个突变体, T277H;ms6,1 个突变体, T295H;msp,1 个突变体, T271H。余建章和荐立于 1985 年发现了与 ms1 等位的 L78-387;马国荣等^[11]从栽培大豆杂交组合后代中发现雄性不育突变体 NJ89-1。杨守萍等^[12]由杂交试验及细胞形态学观察证实:与 ms1、ms2、ms3、ms4、ms5、ms6 等雄性不育基因不等位,与 st 不育系统有相似的雄性联会不育机制,雌性可育。已用于轮回选择的群体合成及育种计划,但难以用于杂种制种。

1.2 细胞质型雄性不育性遗传(Cytoplasmic male sterility, CMS)

CMS 在遗传上呈母性遗传,表明遗传控制因子位于细胞质内。但不育性可以被细胞核中的恢复基因恢复,不育的核基因 Ms 与不育胞质 S 相互作用产生不育性,育性恢复基因 Rf 特异地与 s 胞质相互作用则导致雄性可育, Rf 基因没有被鉴别出来之前,雄性不育系常被认为是细胞质类型的,随着 Rf 基因的发现和鉴别,这种不育类型实际上是一种核质互作现象。育性恢复除受显性、互补、累加作用的主效 Rf 控制外,还涉及到多数的微效、修饰、控制基因,分别对主效基因起到加性、促进和抑制作用。

美国 Davis(1985)申请了一项关于通过栽培大豆间杂交获得质核互作雄性不育三系的专利,不育细胞质来源于大豆品种 Elf,两个隐性细胞核保持基因分别来源于大品种 Bedford 和 Braxton。但未见进一步的报告。20 世纪 90 年代以来,我国的有关研究发展较快。吉林农科院孙寰等^[13]报导了首例中国创造的第一个细胞质雄性不育系:野生型细胞质雄性不育三系(OA、OB)。以后又报告了以栽培大豆质核互作雄性不育系 YA 和保持系 YB,并找到了其恢复系。赵丽梅^[14]以 ZD8319 为母本,另一不育系 YA 的保持系 YB 为父本杂交并多次回交,育成了细胞质雄性不育系 ZA 和保持系 ZB,并找到了恢复系。盖钧镒等^[15]报导了质核互作雄性

不育系 NJCMSIA 及其保持系 NJCMSIB;李磊等^[16]报告了阜 CMSIA、阜 CMS2A 和阜 CMS3A 三个高度不育的质核互作不育系。张磊等^[17-18]报导了 3 个质核互作雄性不育系 W931A、W933A、W936A,并找到恢复力强的恢复系 WR03 WR09 强优势组合 HS9812、HS9814、HS9816。

1.3 光(温)敏感型雄性不育遗传

光敏型育性转换主要受光周期控制,在一定的温度范围内(光敏温度范围),温度作用不大,但超出这个光敏温度范围,则育性失光敏性而受温度控制,把这种类型称为光-温敏型;温敏型育性转换主要受温度控制,光周期不起作用或作用很小。

卫保国^[19]在播期试验中发现一个光温敏雄性不育系(88-428BY-3)。该不育系以光敏为主,日光照时数在 13.5-14.0 h 表现高度雄性不育;15.0-15.5h 雄性育性恢复正常。日光照时数 14.5h 为过渡光周期,14.0 h 为临界光周期。出苗后 20 天 3.5 叶龄的短光周期处理致雄性不育性表达。温度 23-30℃有利于雄性不育性向高度不育转换。彭玉华^[20]报道了一个对播期反应敏感的质核互作大豆不育材料,其两个栽培大豆亲本育性正常, F_1 在短日(晚播)条件下全部不育。并认为该性状是由一对显性核基因控制。汪越胜^[21]在一项控光条件下的光周期研究中发现一光敏雄性不育材料。这类不育系可望用于两系法杂种大豆生产。

2 利用基因工程创造大豆雄性不育可能途径

尝试利用基因工程创造雄性不育的策略主要是利用花粉发育的特异启动子与外源基因嵌合,构建表达载体,转化植物来阻断花粉发育的过程从而达到雄性不育的目的。下面有关利用基因工程创造大豆雄性不育可能途径概括如下。

2.1 特异表达细胞毒素基因创造雄性不育

绒毡层是显花植物花粉发育过程中一种独特的分泌细胞,其活跃的代谢与花粉的发育有着密切的关系。现已发现一些在绒毡层中特异表达的启动子例如 TA13、TA29、A3、A8 和 A9 等^[22-30],将这些启动子与 Barnase 基因嵌合,以破坏绒毡层的发育来创造雄性不育的方法,已被认为是利用基因工程创造雄性不育的成功典范。Barnase 基因是 Hartley 等^[31]在淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*

的“RNA酶/RNA酶抑制因子”防御系统中发现的。此芽孢杆菌能合成一种叫 Barnase 的细胞外 RNA 酶,以保护它不受微生物捕食者的侵害;而 Batstar 则是 Barnase 特异的 RNA 酶抑制因子,被 *B. amyloliquefaciens* 用于保护自身不受 Barnase 细胞毒素的影响。Mariani 等^[32]把 TA29 与 Barnase 基因相连,得到嵌合基因 TA29-Barnase。以 Ti 质粒为载体转化烟草和油菜得到了转基因植株。结果表明,转 Barnase 基因在绒毡层细胞中特异表达,专一性地破坏绒毡层的发育,致使花粉败育。除了花粉败育外,转基因植株在其它方面都是正常的。

2.2 利用反义 RNA 技术获得雄性不育

反义 RNA 技术就是利用一段 DNA(或 cDNA),再反向装上启动子和终止子,使反向 DNA 就能像正常的 DNA 一样转录产生 RNA。但它不能像 mRNA 那样翻译出蛋白,而是与有关的 mRNA 通过碱基互补,形成反义 RNA/mRNA 杂交分子,以便抑制或封闭 mRNA 正常的翻译和表达,达到特异性抑制或下向调节(down-regulation)目的基因的表达。

花粉发育是一个极其复杂的过程,许多基因与花粉发育有关。通过反义 RNA 技术阻断与花粉发育有关的基因的表达同样可以获得雄性不育植株。例如类黄酮是花粉发育过程中的重要物质,苯基苯乙烯酮合成酶(chalcone synthase, CHS)是其生物合成的关键酶。Meer^[33]等将“花药盒序列”(anther box sequence)与 CaMV35S 启动子串联,使其在花药中表达,然后将 CHS 基因的反义 RNA 基因与之串联构建成嵌合基因,导入矮牵牛,实现了 CHS 反义 RNA 基因在矮牵牛花药绒毡层中的表达,抑制了 CHS 的合成,阻碍了花粉的正常发育,得到了雄性不育的矮牵牛植株。雄性不育作母本与正常的品系杂交可正常结实,且后代有 50% 的不育株,表明不育性能稳定遗传。但是究竟怎样培育出恢复系尚待进一步探讨。目前研究发现,CHS 缺失突变体的花粉能在野生柱头上部分萌发,其雄性不育的表型亦可通过添加微摩尔级的黄酮醇而得到恢复^[34]。因而,可通过人工化学合成黄酮醇,在杂种 F₁ 代花期进行喷施,使其花粉育性恢复,从而达到利用杂种优势的目的。

2.3 通过提早降解胼胝质获得雄性不育系

胼胝质是在孢母细胞减数分裂完成后作为小孢子的临时膜,以分隔所产生的四分孢子,防止它们之间相互胼胝连和融合,以及周围二倍体组织或邻近

小孢子的影响。绒毡层中胼胝质酶合成与分泌的特异性对于花粉的正常发育具有决定性作用。正常情况下,在小孢子形成外壁后胼胝,胼胝质壁被绒毡层分泌出的 β -1,3-葡聚糖酶(胼胝质酶)所分解,小孢子随后游离到药室中,该过程有严格的时间性。为此,Worrail 等将经过修饰的 β -1,3-葡聚糖酶基因与拟南芥绒毡层特异表达的启动子 A3 或 A9 重组,并用农杆菌介导的方法培育出转基因烟草,结果发现,在减数分裂时期表达 β -1,3-葡聚糖酶的转基因植株中,出现了从部分不育到全部雄性不育的现象。细胞学观察发现,胼胝质在减数分裂的早期即被 β -1,3-葡聚糖酶所降解,缺少胼胝质壁的花粉母细胞减数分裂表面上是正常的,但花粉壁的发育则表现出异常,花粉壁的形成不是高度有序的沉积模式,而是表现出孢粉素在小孢子表面的随机分布、形成畸形的小孢子,引起雄性不育^[51]。Curtis 等^[35]将 β -1,3-葡聚糖酶连接在 PSL 启动子之下,用农杆菌介导法也获得了莴苣的雄性不育植株。

2.4 细菌基因的表达导致雄性不育

农杆菌 *Rhizogenes* A4 是植物的病原物, Schmulling 等^[26]将其 T-DNA 间的 rolC 基因与 CaMV35S 启动子串联成嵌合基因转化烟草,结果由于 rolC 基因在转基因植株中的系统表达,使得植株在形态上发生了一系列的变化,包括株高降低,顶端优势减弱,叶片色素水平降低,最令人感兴趣的是植物雄性不育。除此之外,rolC 的转基因马铃薯和拟南芥也同样表现雄性不育。而 Spena^[36]等将农杆菌的 rolB 与金鱼草的 tap1 启动子融合后转化烟草,结果花药中的 IAA 含量增加,而 GA 含量却下降,导致花粉发育异常,植株表现雄性不育。

2.5 扰乱线粒体与细胞核之间的信息交流创造雄性不育

分子水平的研究使人们确信细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)与线粒体有关,现在人们已在玉米、矮牵牛、油菜等线粒体 DNA 上找到了与 CMS 有关的基因^[37]。通过基因工程的方法扰乱线粒体与细胞核之间的信息交流,便可导致植物雄性不育, Hernould 等^[38]的工作证实了这一设想。在植物中,ATP 合成酶亚基 9(atp9)是线粒体编码的,其转录产物需要进行编辑后才能形成成熟的 mRNA。Hernould 等分别在 atp9 基因(未编辑)和 cDNA(编辑)前融合了酵母的信号肽序列后连接上 CaMV35S 启动子,然后转化烟草。在转基因烟草植株中,由于基因前端信号肽的作用,表达产物可

以被运送到线粒体中,未编辑的 atp9 表达产物是异常的,该异常产物与正常的 atp9 产物竞争,形成有功能和无功能的 ATP 合成酶的混合物,从而影响线粒体的功能,结果 atp9 基因转化的烟草有全不育、半不育和可育 3 种类型,而对应的 cDNA 转基因烟草完全可育。实验还表明该嵌合基因对其他表型无影响,而专一地影响花粉的发育。

2.6 利用可控制启动——关闭的花药特异启动子获得雄性不育系

若利用可控制启动——关闭的花药特异启动子,如我国农垦 58S 的光敏核不育基因的启动子,温敏核不育基因的启动系,去创建条件性雄性不育种质,则可变目前的三系配套为两系配套,从而使其杂交制种更经济可行。近年来,我国在该领域进行了大量的研究,并已取得一定的进展^[39-42]。

2.7 其它获得雄性不育系途径

由一对隐性基因控制的普通核雄性不育性遗传方式能够满足对植物最佳雄性不育系选育的要求,是大豆等作物杂种优势利用的极好遗传工具。如果能解决其不育系繁殖问题,将优于现有的其他杂种优势利用方式。克隆出普通核雄性不育性的可育基因,通过叶绿体转化,将核雄性不育性可育基因向普通核雄性不育株细胞质转移,创造普通核雄性不育株的保持系;通过种子成熟后表达的启动子,和以位点特异性重组技术为基础的基因开关以及化学诱导启动子的利用,都可能繁殖出 100%不育株率的普通核雄性不育系,创造普通核雄性不育性利用的新途径,对植物杂种优势利用产业有十分重要的意义。

参 考 文 献

1 梁凤山,王斌.小麦雄性不育遗传及基因定位研究进展[J].遗传,2003,25(4):461-465

2 李竞雄,周洪生.作物雄性不育及杂种优势研究进展(I)—国家攀登计划“粮棉油雄性不育和杂种优势基础研究”[C].北京:中国农业出版社,1996,35-41

3 何启伟,郭素英.十字花科蔬菜优势育种[M].北京:中国农业出版社,1993,1-18

4 潘家驹.作物育种学总论[M].北京:中国农业出版社,1996,82-106

5 王长海,蓝海燕,陈友强,等.利用植物绒毡层及花药发育特异基因创造雄性不育[J].西北农业学报,1998,8(2):108-112

6 姜华武,王琳.植物生殖生物学研究进展[J].湖北农学院学报,1998,18(2):178-184

7 Clarke A E,Dennis E,Mol J. Forefronts of flowering[J]. Plant Cell,1991,3:431-433

8 张爱民,肖兴国,聂秀玲.中国的植物转基因雄性不育研究[J].中国科学基金,2000,3:132-136

9 Palmer R G, J Y Gal, H Sun, et al. Production and evaluation of hybrid soybean. In: Jules Janick(ed.). Plant Breeding Reviews. New York: John Wiley & Sons. Inc. 2001. 21, 264-307

10 孙寰,赵丽梅,王曙明,等.大豆杂种优势利用研究进展[J].中国油料作物学报,2003,25(1):92-100

11 马国荣,刘佑斌,盖钧镨,等.大豆雄性不育突变体 NJ89-1 的发现与表现[J].大豆科学,1993,2(2):172-174

12 杨守萍,盖钧镨,徐汗卿.大豆雄性不育突变体 NJ89-1 的遗传学与细胞学鉴定[J].大豆科学,1998,17(1):32-37

13 孙寰,赵丽梅,黄梅.大豆质核互作不育系研究[J].科学通报,1993,38(16):1535-1536

14 赵丽梅,孙寰,黄梅.大豆细胞质雄性不育系 ZA 的选育和研究[J].大豆科学,1998,17(3):268-270

15 盖钧镨,丁德荣,崔章林,等.大豆质核互作不育系 NJCMSIA 的选育及其特征研究[J].中国农业科学,1999,32(4):34-38

16 李磊,杨庆芳,胡亚敏,等.栽培大豆双亲互作型不育材料的发现及其遗传推断[J].安徽农业科学,1995,23(4):304-306

17 张磊,戴欧和,黄志平,等.大豆质核互作 M 型雄性不育系的选育及其育性表现[J].中国农业科学,1997,30(6):90-91

18 张磊,戴欧和.大豆质核互作不育系 W931A 的选育研究[J].中国农业科学,1999,32(4):34-38

19 卫保国.大豆光温敏感型雄性不育系发现的初报[J].作物品种资源,1991,(3):12

20 彭玉华,杨国保,袁建中,等.一个对反应敏感的不育大豆特征分析[J].作物学报,1998,(6):12

21 汪越胜,王晋华.大豆开花期光温综合反应与短光照反应间关系研究[J].安徽农学通报,1999,(3):12

22 汪迎春,孙勇如,张利明,等.植物花药花粉特异性基因的调控序列[J].生物工程进展,2000,20(2):52-54

23 王台,董哲,赵玉锦.应用分子生物学方法诱导植物雄性不育:生物学基础和前景[J].大自然探索,1992,11(4):45-51

24 梁明山,陈浩,曾宁,等.植物器官的基因表达[J].大自然探索,1996,15(1):60-65

25 倪曰.高等植物花器官发育的分子基础[J].西南农业学报,1998,12(1):112-121

26 李胜国,刘玉乐,田波.植物花粉发育的分子生物学研究进展[J].生物工程进展,1997,17(2):17-22

27 华传明,陈睦传,沈明山.从柱头到胚囊—花粉管发育研究进展[J].生物工程进展.1998,18(6):32-35

28 Mascarenhas J P. Gene activity during pollen development[J]. Anun Rev Plant Physiol Mol Bioi,1990,41:317-338

29 张英涛,杨海东,陈朱希昭.绒毡层研究进展[J].植物学通报,1995,13(4):6-13

30 孟金陵.植物生殖遗传学[M].北京:科学出版社,1995,36-42

31 Hartley R W. Barnase and barstar, two small protein to fold and fit together[J]. Trends Biochem Sci.,1989,14:450-454

32 Mariani C,Beuckeleer M D,Truettner J, et al. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene[J]. Nature, 1990, 347: 737-741

33 Meer I M,Spelt C E,Mol J N M, et al. Promoter analysis of the

- chalcone synthase gene of petunia hybrid, A 67bp promoter region directs flower-specific expression[J]. *Plant Biol*, 1990, 15, 95-109
- 34 Mo Y Y, Nagel C, Taylor L P, et al. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavanols in unactional pollen[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89, 7213-7217
- 35 Curtis I, He S, Scott C P, et al. Genomic male sterility in lettuce, a base line for the production of F₁ hybrids[J]. *Plant Sci*, 1996, 113, 113-119
- 36 Spean A E, Struch J J, Prinsen E, et al. Anther-specific expression of the rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes* increases IAA content in anthers and alters anther development and whole flower growth[J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84, 520-527
- 37 李传友, 孙兰珍. 植物细胞质雄性不育的分子机理[J]. 山东农业大学学报, 1996, 27(1), 112-117
- 38 Hernould M, Suharsono S, Litvaks, et al. Male-sterility Induction in transgenic tobacco plants with an unedited atp9 mitochondrial gene from wheat[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1993, 90, 2370-2374
- 39 缪颖, 陈睦传. 植物雄性不育基因的研究进展[J]. 植物学通报, 2000, 17(1), 1-10
- 40 林兴华, 余功能, 张端品, 等. 农垦 58S 光敏不育基因在水稻第 5 条染色体上确定[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(1), 1-5
- 41 李子银, 林兴华, 谢岳峰, 等. 利用分子标记定位农垦 58S 的光敏核不育基因[J]. 植物学报, 41(7), 731-735
- 42 梅明华, 陈亮, 章志宏, 等. 农垦 58S 光敏不育基因突变位点的确定及 pms3 区的进一步作图[J]. 中国科学(C 辑), 1999, 29(3), 310-315

HEREDITY AND GENE ENGINEERING ON MALE STERILITY IN SOYBEAN

Liang Huizhen¹ Li Weidong¹ Xu Yang² Chang Hongjie³ Chen Xinwei⁴

(1. Cotton & Oil Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002; 2. Agricultural Research Institute of Nan Ying; 3. Agricultural Research Institute of Ping Ding-shan; 4. Agricultural Research Institute of Shang Qiu)

Abstract The study of soybean male sterility has an important sense for utilization of heterosis. The heredity of soybean male sterility and the possible paths with gene engineering creating male sterility were reviewed in this paper, and the heterosis utilization of them was prospected.

Key words Soybean; Male sterility; Gene engineering; Heterosis utilization

欢迎订阅《今日广西》杂志

《今日广西》是反映广西各地各行各业新成就的综合性期刊。如果你是广西人, 身处异乡, 每月花 4 元钱订一份《今日广西》, 就能全面了解家乡的变化, 多合算啊!

邮发代号: 48-105