

K、V、T 型小麦细胞质雄性不育系叶绿体 DNA 的 SSR 分析及 RuBP 羧化酶活性比较

袁 凯^{1,2}, 张 婷², 史晓芳², 行翠萍², 李楠楠³, 高庆荣^{1*}

(1 山东农业大学 农学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; 2 山西省农业科学院 小麦研究所, 山西临汾 041000; 3 河南省周口市农业科学院, 河南省小麦种质改良工程技术研究中心, 河南周口 466001)

摘 要: 为了探讨小麦细胞质雄性不育(CMS)与叶绿体 DNA(cpDNA)的关系, 揭示 CMS 机理。以 2 套 K、V、T 型同核异质不育系(A)及其保持系(B)‘太 911289’和‘冀 5418’、育性恢复的 F₁ 和各自的质供体粘果山羊草(*Aegilops kotschy*)、偏凸山羊草(*Aegilops ventricosa*)、提莫非维小麦(*Triticum timopheevii*)为试验材料, 利用 cpSSR 引物对小麦 cpDNA 进行比较分析, 筛选出代表不同胞质不育系的引物, 探讨 CMS 与叶绿体的关系; 同时测定由叶绿体 DNA 与核 DNA 共同编码的 RuBP 羧化酶的活性, 为小麦 K、V、T 雄性不育类型的应用提供理论依据。结果表明: (1) K 型、V 型、T 型不育系与保持系的 cpDNA 之间均呈现多态性, 且不同的细胞质之间存在特异片段, 这从 DNA 水平上提供了 3 类不育系胞质来源不同的证据, 并分别找到 5 对和 7 对可以鉴定 V 型和 T 型不育系的特异引物。(2) 除 K 型‘冀 5418’与其胞质供体的 cpDNA 出现差异外, 不育系与其胞质供体的 cpDNA 没有差异, 而且不育系与其育性恢复的 F₁ 代 cpSSR 扩增片段之间也没有差异, 很好地遗传了其母本性状。(3) 在起身期和开花期, 不仅 2 套不育系的 RuBP 羧化酶活性显著高于保持系, 且在不育系与恢复系杂交的 F₁ 中, 随着育性的恢复其 RuBP 羧化酶活性高于保持系而低于各自不育系; 而在拔节期的不育系与保持系之间、不育系之间、以及 F₁ 代与不育系和保持系之间的 RuBP 酶活性大小没有显著差异。这可能与拔节期主要是营养生长有关系。

关键词: 细胞质雄性不育; cpSSR; 叶绿体; cpDNA; RuBP 羧化酶

中图分类号: Q346⁺.5; Q789; S512.1⁺1 **文献标志码:** A

Comparison of Chloroplast DNA and RuBP Carboxylase (rubisco) Activity with K, V, T-type Cytoplasmic Male-sterile Wheat Lines

YUAN Kai^{1,2}, ZHANG Ting², SHI Xiaofang², XING Cuiping², LI Nannan³, GAO Qingrong^{1*}

(1 Agronomy College, Shandong Agricultural University, National Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018 China; 2 Wheat Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Linfen, Shanxi 041000, China; 3 Zhoukou City Academy of Agricultural Sciences, Wheat Germplasm Improvement Engineering Research Center of Henan Province, Zhoukou, Henan 466001, China)

Abstract: Cytoplasmic male-sterile (CMS) lines, especially K (*Aegilops kotschy*), V (*Aegilops ventricosa*), and T (*Triticum timopheevii*) types of cytoplasm, are of high value in heterosis utilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). The aim of this study was to discuss the relationship between CMS and chloroplast and to reveal the mechanism of CMS by investigating chloroplast DNA and RuBP carboxylase (rubi-

收稿日期: 2018-11-19; 修改稿收到日期: 2019-02-01

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0101602); 山西省农科院生物育种工程项目(17yzgc013); 山西省重点研发计划(201703D211007-10); 山西省青年基金(201801D221314); 山西省农业科学院博士研究基金(YBSJJ1811)

作者简介: 袁 凯(1986-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事小麦杂种优势的研究与应用。E-mail: yking123@yeah. net

* 通信作者: 高庆荣, 教授, 博士生导师, 主要从事小麦杂种优势的研究与应用。E-mail: gaoqingr@sdau. edu. cn

sco) activity in CMS male-sterile lines. The experiment was conducted with cultivars of the K, V, T-type CMS lines, the common maintainer 'Tai 911289' and 'Ji 5418', the F₁ hybrids and the cytoplasmic donors under field conditions. The major results are as follows: (1) the polymorphism between male sterile lines and maintainer lines in cpDNA, and specific fragment in the different cytoplasm type male sterile lines provides evidence of three types of cytoplasm male sterile lines from different sources, and found 5 specific primers and 7 specific primers respectively to identify V and T type sterile lines. (2) There is no difference in cpDNA between the male sterile lines and their cytoplasm donors, except K 'ji5418', and because of its nature of maternal inheritance also showed no polymorphism in cpSSR amplified fragment between the male sterile lines and its fertility restoration in the F₁ generation. (3) RuBP carboxylase activity of two sets of male sterile lines was significantly higher than that of maintainer lines. In the F₁ generation, with the recovery of fertility restorer, its RuBP carboxylase activity is higher than that of maintainer lines, but lower than the respective male sterile lines in standing and flowering period. However, there is no difference between them in jointing stage.

Key words: cytoplasmic male sterility; cpSSR; chloroplast; cpDNA; ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase

细胞质雄性不育系(cytoplasmic male sterility, CMS)是由于雄蕊退化,花粉败育或功能不育等原因造成的雄蕊不能正常授粉而雌蕊功能正常的现象。自 1951 年 Kihara^[1] 获得质核互作的尾状山羊草(*Aegilops caudata*) 细胞质雄性不育系以来, CMS 已成为小麦杂种优势利用的重要途径。目前, K 型(*Aegilops kotschy*)、V 型(*Aegilops ventricos*)和 T 型(*Triticum timopheevii*) CMS 是杂交小麦研究中几种重要的胞质类型^[2-4], 因此加强 K、V、T 型不育系的研究对小麦杂种优势利用具有重要的意义。为了探寻细胞质雄性不育机理, 对不同类型小麦细胞质效应进行了大量研究, 并从细胞生物学^[5-6]、生理生化^[7-8] 和分子生物学^[9] 等方面对不育机制进行了探讨, 其中, 对不育分子机理的研究多集中于线粒体^[10-11]。Hernould 等^[12] 在线粒体 DNA 中找到了 2 个可能与细胞质雄性不育有关的基因位点: *orf256* 基因及 *orf25* 基因, 汪月^[13] 发现 K 型不育系和可育系的差异蛋白质主要参与了苯丙氨酸代谢、内质网相关代谢途径和糖代谢过程, 这些代谢过程可能影响小麦 K 型不育系的花粉育性。李骞骞^[14] 发现 T 型不育系在小孢子败育的关键期——单核期, 由于绒毡层细胞解体开始时间晚, 速度快, 磷酸戊糖途径下调导致无法为小孢子的生长持续供能, 使能量供应不足, 雄配子无法正常生长而败育。这些研究主要集中在线粒体上。而叶绿体是植物所特有的细胞器, 它和线粒体一样具有自主性, 是高等植物核外的另一类遗传系统, 关于叶绿体与 CMS 的关系研究较少, 本试验就对叶绿体 DNA (cpDNA) 和 1,5 二磷酸核酮糖羧化酶(RuBP 羧化酶)对

CMS 的影响展开讨论。叶绿体微卫星(chloroplast simple sequence repeat, cpSSR)是一种高效的分子标记技术, 由于具有微卫星标记共显性、高多态性、分布广泛性等优点, 又兼顾到叶绿体基因组结构简单、相对保守、单亲遗传等特点, 目前已广泛用于植物群体遗传分析及系统发育和细胞质遗传分析等研究^[15]。本研究利用以‘太 911289’和‘冀 5418’细胞核为遗传背景的 2 套同核异质小麦不育系及其保持系、不育系与恢复系杂交的 F₁ 为材料, 利用开发的 cpSSR 引物对以上材料的 cpDNA 进行分析, 探讨 CMS 与叶绿体 DNA 的关系。1,5 二磷酸核酮糖羧化酶(RuBP 羧化酶)约占 C₃ 植物成熟叶片内总可溶性蛋白的 50%, 是植物细胞叶绿体内含量最丰富的蛋白。RuBP 羧化酶由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成, 其中大亚基由叶绿体 DNA 编码, 是在叶绿体 70S 核糖体上合成的; 小亚基为核 DNA 所编码, 是在细胞质 80S 核糖体上合成, 因此, RuBP 羧化酶是研究叶绿体遗传及叶绿体与细胞核相互作用的理想标志^[16]。

1 材料和方法

1.1 材 料

供试小麦材料共 17 个, 其中同核异质的 K、V、T 型雄性不育系‘太 911289’和‘冀 5418’各 1 套, 恢复系为 758461-4。其配置的杂种小麦 6 个, 即: K ‘太 911289’A/758461-4、V ‘太 911289’A/758461-4、T ‘太 911289’A/758461-4、K ‘冀 5418’A/758461-4、V ‘冀 5418’A/758461-4 和 T ‘冀 5418’A/758461-4。3 个胞质来源: 粘果山羊草(*Ae.*

Kotschy)、偏凸山羊草(*Ae. ventricosa*)和提莫菲维小麦(*T. timopheevii*)。种植于山东农业大学农学试验站。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取

采用侯典云^[17]提供的方法提取叶绿体 DNA。

1.2.2 Rubp 羧化酶的提取及活性测定

RuBP 羧化酶的提取按侯泽豪等^[18]的方法进行。取小麦花药 0.25 g(鲜质量)置于预冷的研钵中,加入 2 mL 预冷的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液($\varphi=10\%$ 甘油、 $\omega=1\%$ PVP、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.8),冰浴中研磨,匀浆后于 4 °C 下 15 000 g 离心 20 min,取上清液待测。RuBP 羧化酶活性参照魏爱丽等^[19]的分光光度法进行测定。

1.2.3 cpSSR 引物的设计

共筛选了 69 对 cpSSR 引物,于上海生物工程公司合成,分别在 2 套不育系及其保持系, F₁ 代、及细胞质原始亲本之间的叶绿体 DNA 进行了扩增。其中 24 对为 Ishii 等^[20]针对中国春小麦的叶绿体基因组序列设计的微卫星引物,其余 45 对是运用 SSRhunter 软件结合 NCBI 数据库自行设计,覆盖叶绿体 DNA 的全部序列。其中有 16 对存在多态性。

1.2.4 PCR 扩增

PCR 扩增反应在 TaKaRa PCR 上进行。在 94 °C 下变性 5 min;然后进行 35 个循环的扩增,每个循环为 94 °C 变性 2 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 7 min;72 °C 延伸 10 min;扩增结束后,加入 2.5 μ L 溴酚蓝,置于 4 °C 保存待检测。

1.3 数据统计与分析

采用 Excel 2003 和 SAS V8.0 软件对 RuBP 羧化酶的活性进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同类型不育系与保持系之间的 cpDNA 分析

从 SSR 扩增产物来看,共有 16 对引物的扩增结果表现出多态性(图 1)。以‘太 911289’为保持系的 3 种不育系的扩增结果表明,8 对引物 AB027572. 1-1(图 1,A)、AB027572. 1-3(图 1,C)、AB027572. 1-5(图 1,D)、AB042240-2(图 1,E)、Wct-3(图 1,J)、Wct-5(图 1,L)、Wct-10(图 1,M)和 Wct-13(图 1,O)在其与 K‘太 911289’不育系间扩增出多态性;8 对引物 AB027572. 1-1(图 1,A)、AB027572. 1-3(图 1,C)、AB027572. 1-5(图 1,D)、AB042240-5(图 1,H)、Wct-2(图 1,I)、Wct-3(图 1,J)、Wct-10(图 1,M)和 Wct-15(图 1,P)在其与 V

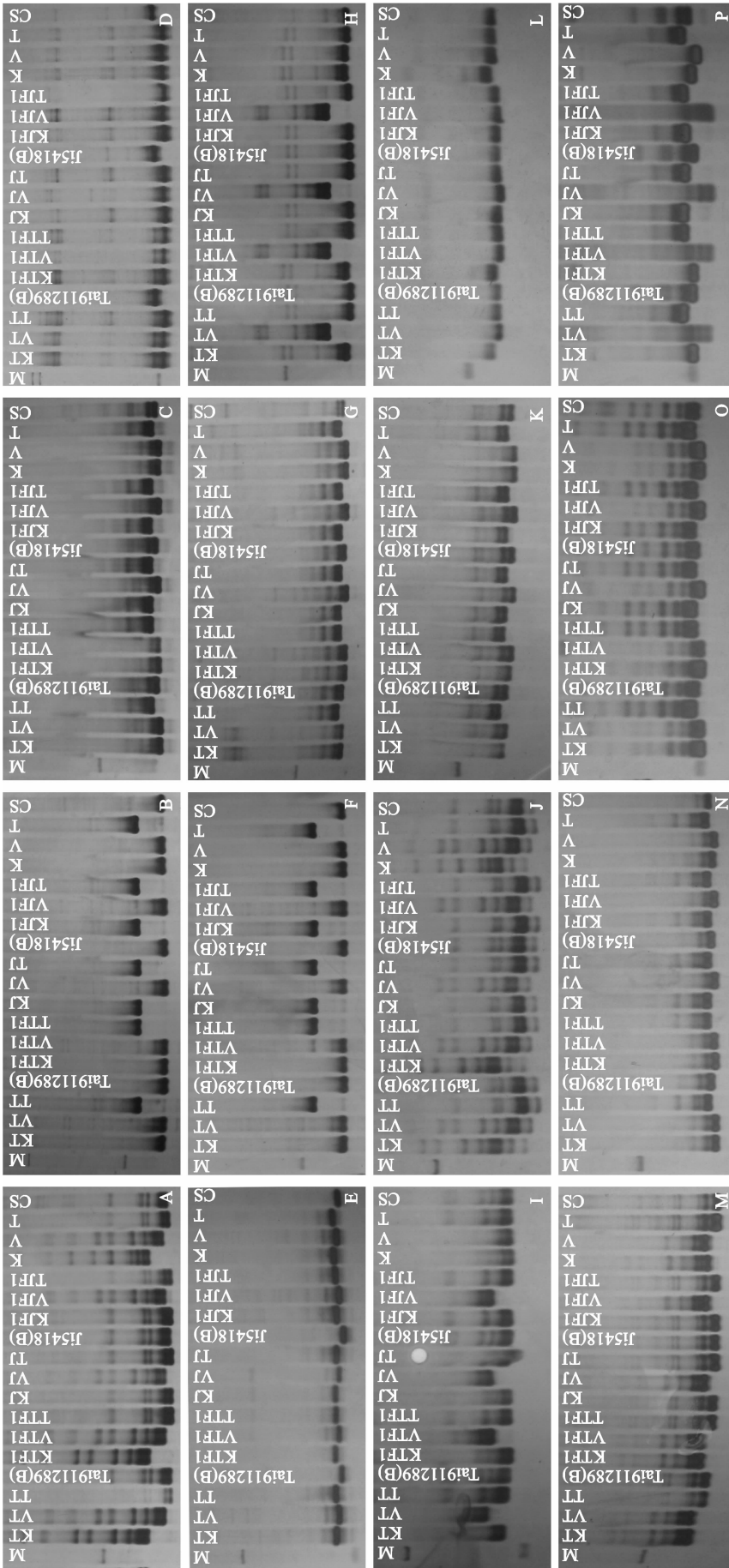
‘太 911289’之间扩增出多态性;9 对引物 AB027572. 1-2(图 1,B)、AB027572. 1-3(图 1,C)、AB027572. 1-5(图 1,D)、AB042240-2(图 1,E)、AB042240-4(图 1,F)、AB042240-17(图 1,G)、Wct-4(图 1,H)、Wct-11(图 1,N)和 Wct-15(图 1,P)在其与 T‘太 911289’不育系之间扩增出多态性。

以‘冀 5418’为保持系的 3 种不育系的扩增结果发现,除 K‘冀 5418’不育系外,其他 2 种胞质的不育系与保持系的差异与上述的多态性引物完全相同。共有 5 对引物在 K‘冀 5418’中表现出多态性,分别为引物 AB027572. 1-2、AB027572. 1-5、AB042240-2、AB042240-4 和 Wct-15。以上结果表明,除 V‘冀 5418’和 T‘冀 5418’以外因为细胞质的不同,不育系 cpDNA 与保持系 cpDNA 有明显差异。

本研究采用的 2 套同核异质不育系,试图明确不同胞质不育系在 cpDNA 中所存在的本质差异。3 种胞质的不育系 cpDNA 存在明显差异,引物 AB027572. 1-1 和 Wct-3 的扩增结果看出,3 种胞质的扩增片段各不相同,这从分子水平上提供了不育系胞质来源不同的证据,与李传友等^[21]对该 3 类不育系线粒体 DNA 的 RFLP 分析结果一致。由此可以用作不同胞质不育系的鉴定,在这个结果下,V 型和 T 型胞质各有 5 对和 7 对引物扩增出代表各自胞质的特异片段,可以用于进行胞质类型的鉴定(表 1)。K 型胞质的叶绿体则没有在两套不育系中找出特异的片段标。

2.2 同胞质材料之间的 cpDNA 分析

在同质异核的两套不育系之间,由于胞质是相同的,所以同胞质材料的 cpDNA 之间理论上不会产生多态性。试验结果表明共有 12 对引物在 K‘冀 5418’(A)与 K‘太 911289’(A)之间扩增出多态性,分别为引物 AB027572. 1-1(图 1,A)、AB027572. 1-2(图 1,B)、AB027572. 1-3(图 1,C)、AB042240-4(图 1,F)、AB042240-17(图 1,G)、Wct-3(图 1,J)、Wct-4(图 1,K)、Wct-5(图 1,L)、Wct-10(图 1,M)、Wct-11(图 1,N)、Wct-13(图 1,O)和 Wct-15(图 1,P),同时这些引物也在 K‘冀 5418’与其胞质供体稷果山羊草之间同样也出现多态性。而在 V 型及 T 型材料之间是没有多态性的,除了 K‘冀 5418’以外,都很好体现了各自的胞质效应。出现这样的现象可能是由于 K 型胞质的叶绿体 DNA 不稳定,在不同的细胞核背景下会发生突变引起的。



M. DNA Marker; K. T. K* Tai911289'; V. T. V* Tai911289'; TT. T* Tai911289'; Tai911289(B); KTF1. K. T. F.; VTF1. V. T. F.; TTF1. T. T. F.; KJ. K* 冀 5418'; VJ. V* 冀 5418'; TJ. T* 冀 5418'; J5418(B); KJF1. K. J. F1; VJF1. V. J. F1; V. 冀 F1; TJF1. T. J. F1; T. 冀 F1; K. 粘果山羊草; V. 偏凸山羊草; T. 提莫菲维小麦; CS. 中国春
 A. AB027572. 1-2; C. AB027572. 1-3; D. AB027572. 1-5; E. AB042240-2; F. AB042240-4; G. AB042240-17; H. AB042240-5;
 I. Wct-2; J. Wct-3; K. Wct-4; L. Wct-5; M. Wct-10; N. Wct-11; O. Wct-13; P. Wct-15

图 1 16 对引物扩增图

M. DNA Marker; K. T. K* Tai911289'; V. T. V* Tai911289'; TT. T* Tai911289'; Tai911289(B); KTF1. K. T. F.; VTF1. V. T. F.; TTF1. T. T. F.; KJ. KJ5418'; VJ. VJ5418'; TJ. TJ5418'; J5418(B); KJF1. K. J. F1; VJF1. V. J. F1; V. 冀 F1; TJF1. T. J. F1; T. 冀 F1; K. *Ae. Kotschy*; V. *Ae. Ventricosa*; T. *T. timopheevi*; CS. Chinese Spring.
 A. AB027572. 1-1, B. AB027572. 1-2, C. AB027572. 1-3, D. AB027572. 1-5, E. AB042240-2, F. AB042240-4, G. AB042240-17,
 H. AB042240-5, I. Wct-2, J. Wct-3, K. Wct-4, L. Wct-5, M. Wct-10, N. Wct-11, O. Wct-13, P. Wct-15

Fig. 1 Amplification results of 16 primer pairs

表 1 鉴定不同细胞质不育系特异引物

Table 1 Specific primers of different cytoplasmic male sterile lines

引物名称 Name	不育系特异片段长度 Fragment size of male sterile lines/bp	细胞质供体特异片段长度 Fragment size of cytoplasm donors/bp
AB027572. 1-1	185	185
AB042240-5	330	330
V 型 V-type	Wct-2	153
Wct-3	190	190
Wct-15	220	220
AB027572. 1-2	235	235
AB027572. 1-3	193	193
AB042240-4	427	427
T 型 T-type	AB042240-17	180
Wct-4	228	228
Wct-11	180	180
Wct-15	215	215

从图中看出,不育系与其 F_1 代的 cpDNA 无差异,没有因为恢复基因的进入而影响了 cpDNA 的稳定遗传,且在突变性较强的 K‘冀 5418’与其 F_1 代之间也没有出现差异性。这种情况说明,恢复基因没有对不育系的 cpDNA 产生影响。

2.3 RuBP 羧化酶活性的分析

RuBP 羧化酶由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成,其中大亚基由叶绿体 DNA 编码,是在叶绿体 70S 核糖体上合成的;小亚基为核 DNA 所编码,是在细胞质 80S 核糖体上合成。不育系与其保持系的叶绿体 DNA 有差异,RuBP 羧化酶大亚基不同,会影响各自产生的酶的活性,如表 2 所示,在苗期‘太 911289’不育系的 RuBP 羧化酶活性都极显著高于其保持系 $0.1034 \sim 0.310 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($F=437.69$),‘冀 5418’细胞核不育系也都极显著高于其保持系 $0.1264 \sim 0.1630 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($F=153.51$),同理由于不育系之间 cpDNA 的不同,酶活性也有差异,具体表现为 K‘太 911289’>T‘太 911289’>V‘太 911289’,V‘冀 5418’>K‘冀 5418’>T‘冀 5418’。

从 F_1 代的表现来看,‘太 911289’细胞核背景的 F_1 代极显著高于其保持系 $0.025 \sim 0.082 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($F=437.69$),而显著低于其母本不育系,而‘冀 5418’细胞核背景的 F_1 代除 T 冀 F_1 外都极高于其保持系 $0.0857 \sim 0.109 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($F=153.51$)。

在拔节期,不育系与保持系之间,不育系之间,还有 F_1 代与不育系和保持系之间 RuBP 羧化酶活

性的大小没有显著差异,而且各个不育系及 F_1 代的酶活性相较其苗期酶活性有所降低,育性的改变并没有对酶活性产生影响。

在开花期,‘太 911289’细胞核不育系的 RuBP 羧化酶活性都极显著高于其保持系 $0.1367 \sim 0.3837 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($F=2058.51$),‘冀 5418’细胞核不育系的 RuBP 羧化酶活性都极显著高于其保持系 $0.0906 \sim 0.2900 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($F=275.24$),而且不育系之间酶活性也有差异,表现为 K‘太 911289’>T‘太 911289’>V‘太 911289’,K‘冀 5418’>V‘冀 5418’>T‘冀 5418’。

从 F_1 代的表现来看,‘太 911289’细胞核背景的 F_1 代极显著高于其保持系 $0.0367 \sim 0.0847 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($F=2058.51$)且显著低于其母本不育系,而‘冀 5418’细胞核背景的 F_1 代除 K 冀 F_1 外极高于其保持系 $0.0356 \sim 0.05800 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($F=275.24$),且显著低于母本不育系。

3 讨论

细胞质雄性不育是核-质互作导致的花粉败育,其中胞质遗传系统包括叶绿体、线粒体遗传系统。核-叶绿体-线粒体三者既相互独立,又相互联系、渗透、影响。在长期的系统进化中,植物形成了三者协调的关系,从而保证了植物正常生长发育。然而一旦协调被打破,花粉发育过程中核质之间正常的信息交流改变,导致花粉败育^[22]。袁建等^[23]研究发现

表 2 不育系(A)、保持系(B)及 F₁ 代各时期 RuBP 羧化酶活性的比较

Table 2 A comparison on the RuBP carboxylase activity of male sterile (A), maintainers(B) and F₁ in different stage

材料 Material	酶活性 Enzymatic activity /($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		
	苗期 Seedling stage	拔节期 Jointing stage	开花期 Florescence
K 太 KT911289	0.4153aA	0.1123aA	0.6750aA
V 太 VTai911289	0.2087cC	0.0917aA	0.4280cC
T 太 TTai911289	0.2773bB	0.0933aA	0.4563bB
太 911289(B) Tai911289(B)	0.1053fE	0.1163aA	0.2913gG
K 太 F ₁ KTF ₁	0.1303eD	0.0997aA	0.3760dD
V 太 F ₁ VTF ₁	0.1873dC	0.1057aA	0.3280fF
T 太 F ₁ TTF ₁	0.1860dC	0.0990aA	0.3430eE
KJ5418	0.3696bAB	0.1150aA	0.6760aA
VJ5418	0.3863aA	0.0923aA	0.5063bB
TJ5418	0.3497cBC	0.0833aA	0.4766cC
J5418(B)	0.2233fE	0.1103aA	0.3860fF
KJF ₁	0.3323dC	0.0940aA	0.4110eEF
VJF ₁	0.3090eD	0.1167aA	0.4440dD
TJF ₁	0.2340fE	0.0790aA	0.4216eED

注: 数字后不同大小写字母表示材料间显著($P=0.05$)或极显著水平($P=0.01$)

Notes: Values followed by a different normal or capital letter are significantly different between materials at 0.05 and 0.01 probability level, respectively

线粒体基因组的变异重组与 CMS 的关系非常密切。而 CMS 与 cpDNA 是否有关,存在较多争议,主要是因为叶绿体基因的相对保守性。Li 等^[24]以玉米、小麦和油菜为材料对 cpDNA 和 CMS 的关系进行了研究,发现 cpDNA 的改变与这 3 种作物的 CMS 有关。刘一农等^[25]通过研究发现,油菜 CMS 系与其保持系的 cpDNA 之间存在明显的差异,因此认为 cpDNA 在长期进化过程中,其核苷酸序列上发生了某些变异,这些变异可能破坏了原有的固有平衡,从而导致 CMS 的形成。本试验中,对 3 种细胞质不育系和其 2 个保持系的叶绿体 DNA 进行了 SSR 分析,发现不育系与保持系中存在多态性,且由于细胞质效应,不育系之间也有差异。

本试验所用 K、V、T3 种胞质不育系是分别以‘太 911289’和‘冀 5418’为轮回亲本,经过 10 代以上的连续回交选育而成的, K、V、T 不育系及保持系的核遗传背景相同而胞质来源不同,材料在育性

上表现出的差异,应该取决于细胞质基因或核质互作的结果。SSR 分析结果揭示出不育系材料的 cpDNA 与其相应保持系存在明显的差异,而且各有不同,具有明显的胞质效应。

He. S 等^[26]的研究表明,大豆 CMS 是由线粒体 DNA(mtDNA)上的特异序列 *pvs*(*phaseolus vulgaris sterility*)决定的,而在杂种 F₁ 代中,由于核恢复基因的引入,*pvs* 序列缺失,从而育性恢复。孙兰珍等^[27]发现用 RAPD 分析很容易找出不育系与保持系 mtDNA 之间的差异,因为不育系与保持系的胞质来源是不同的。但要在众多的差异中鉴定出真正与 CMS 有关的差异片段是困难的。本试验发现,不育系与保持系由于胞质来源的不同,它们的 cpDNA 也有差异,但是不育系与其育性恢复的 F₁ 代却没有不同,恢复基因与不育基因的互作使育性恢复并不是 cpDNA 发生改变而产生的结果。这说明 cpDNA 与 CMS 没有直接的关系。

而这不能说明叶绿体的其他方面与 CMS 没有关系,焦健等^[28]对 K、V、T 型雄性不育系研究表明, K、V、T 型细胞质对其净光合速率产生不同程度的负向效应,尤以 K、T 型表现最明显,而 V 型与保持系差异不显著,二者研究结果相似。焦健等^[29]随后发现与保持系相比 K、V、T 型细胞质对不育系有不良影响;吴世文等^[30]研究发现 K、V、T 型细胞质对不育系的光合功能有不良胞质效应,但经过恢复系恢复后, K、V、T 型细胞质对杂种 F₁ 的光合生理特性不具有不良效应,甚至有利于净光合速率的提高。袁凯等^[31]对叶绿体电镜结构的研究发现 K、T 型雄性不育系叶绿体数目少于保持系,而 V 型叶绿体数目与保持系相当。3 种不育系叶绿体结构、形状表现异常,具有明显的胞质效应;恢复基因不仅能恢复 K、V、T 型不育系的育性,且能使其叶绿体结构、形状恢复正常。

作为叶绿体基因组的产物,细胞质雄性不育系与保持系的 RuBP 羧化酶大亚基的差异,可以说是由于叶绿体遗传系统的变化而引起的。由于不育系之间的 cpDNA 都有差异,而且不育系与其 F₁ 代的 cpDNA 是一样的,在苗期和开花期, RuBP 羧化酶活性不仅在两套不育系与保持系间存在着差异,在不育系与恢复系杂交的 F₁ 中,随着育性的恢复 RuBP 羧化酶活性也发生了变化, F₁ 代的酶活性高于恢复系而低于不育系。在不育系与恢复系杂交中,叶绿体是随母本遗传的,而双亲的核基因组的融合是杂交过程中的主要变化,这样在 F₁ 中 RuBP 羧

化酶大亚基仍保持不育系的大亚基,而在 F_1 的细胞核中融合了双亲的小亚基的基因。因此, F_1 代酶活性发生了变化。而在拔节期, RuBP 羧化酶活性在材料之间没有出现差异,这可能是由于这个时期主要进行营养生长,还没有到育性分化的时期引起的。但并不能就此推断恢复基因与小亚基的基因有密切关系。

虽然不育系与保持系 cpDNA 有差异,但是与其 F_1 代并没有差异,说明恢复基因并没有对不育系叶绿体 DNA 产生影响, cpDNA 与 CMS 没有直接

的关系,但是找到了可以鉴定 V、T 型细胞质雄性不育系的特异 SSR 引物,并且 K 型胞质的叶绿体 DNA 不稳定,在不同的细胞核背景下会发生改变。这种不稳定性会产生什么样的影响,还有待进一步研究。

不育系的 RuBP 羧化酶活性在育性分离时期极显著高于保持系,在不育系与恢复系杂交的 F_1 代中,随着育性的恢复 RuBP 羧化酶活性降低。但是由恢复基因或者恢复基因以外的基因影响的,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] KIHARA H. Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations[J]. *Cytologia*, 1951, **16**(2): 177-193.
- [2] 高庆荣, 刘保申, 孙兰珍, 等. K、V、A 型杂种小麦细胞质效应的比较研究[J]. 麦类作物, 1998, **18**(4): 1-3, 9.
GAO Q R, LIU B S, SUN L Z, *et al.* Comparative study on cytoplasmic effects of K, V and A type hybrid wheat[J]. *Tritical Crops*, 1998, (4): 1-3, 9.
- [3] 张改生, 杨天章. 偏型、粘型和易型小麦雄性不育系的初步研究[J]. 作物学报, 1989, **15**(1): 1-10.
ZHANG G S, YANG T Z. A preliminary on the male sterile lines of wheat with *Ae. ventricosa*, *Ae. kotschyi* and *Ae. varabilis* cytoplasm[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1989, **15**(1): 1-10.
- [4] 郭瑞星, 邵仁学, 湖北省种子总公司. 小麦杂种优势利用研究进展[J]. 湖北农业科学, 1996, **35**(6): 25-28.
GUO R X, SHAO R X, HUBEI P S C. Advances in research on utilization of wheat heterosis[J]. *Hubei Agricultural Science*, 1996, **35**(6): 25-28.
- [5] 李传友, 孙兰珍. 普通小麦 T 型, V 型和 K 型细胞质雄性不育系花粉败育机理的细胞学研究[J]. 华北农学报. 1996, **11**(2): 1-8.
LI C Y, SUN L Z. Cytological studies on pollen abortion mechanisms of cytoplasmic male sterile line of T, V and K types in wheat[J]. *Acta Agireultuare Boreali-Sinica*, 1996, **11**(2): 1-8.
- [6] 张晓科, 张改生, 王军卫. 小麦细胞质雄性不育机理的研究进展[J]. 麦类作物, 1997, **17**(2): 4-7.
ZHANG X K, ZHANG G S, WANG J W. Advances in research on mechanism of cytoplasmic male sterility in wheat[J]. *Tritical Crops*, 1997, **17**(2): 4-7.
- [7] 乔晓琳, 高庆荣, 赵桂清, 等. K、V、T 型小麦细胞质雄性不育系籽粒的醇溶蛋白分析[J]. 生物技术, 2006, **16**(1): 20-22.
QIAO X L, GAO Q R, ZHAO G Q, *et al.* Analyses of gliadins in seeds of K, V, T type cytoplasmic male sterile wheat[J]. *Biotechnology*, 2006, **16**(1): 20-22.
- [8] 乔晓琳, 高庆荣, 张爱民, 等. 小麦 K、V、T、CHA 细胞质雄性不育类型的光合特性分析[J]. 作物学报, 2006, **32**(9): 1 323-1 328.
QIAO X L, GAO Q R, ZHANG A M, *et al.* Analysis of photosynthetic characteristics of K, V, T and CHA-cytoplasmic male sterile lines of wheat[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, **32**(9): 1 323-1 328.
- [9] 王永飞, 马三梅, 张鲁刚, 等. 植物细胞质雄性不育的分子机理研究进展[J]. 自然科学进展. 2002, **12**(10): 1 009-1 014.
WANG Y F, MA S M, ZHANG L G, *et al.* Advances in molecular mechanism of cytoplasmic male sterility[J]. *Progress in Natural Science*, 2002, **12**(10): 1 009-1 014.
- [10] 胡适宜, 王模善, 徐丽云. 小麦雄性不育系和保持系小孢子发育的电子显微镜观察[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 1977, (2): 63-75.
HU S Y, WANG M S, XU L Y. Electron-microscope observations on the microsporogenesis in male-sterile and its main-trainer-lines of wheat[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 1977, (2): 63-75.
- [11] LEVINGS C S 3RD, PRING, D R. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize[J]. *Science* (New York, n. y), 1976, **193**(4 248): 158-160.
- [12] HERNOULD M, SUHARSONO S, LITVAK S, *et al.* Male-Sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *apt9* mitochondrial gene from wheat[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, **90**(6): 2 370-2 374.
- [13] 汪月. 小麦 K 型胞质雄性不育花药差异蛋白质组学的研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2018.
- [14] 李骞骞. 小麦 T 型不育系及其保持系花药电镜观察和全蛋白的 iTRAQ 分析[D]. 山东农业大学, 2015.
- [15] BRYAN G J, MCNICOLL J, RAMSAY G, *et al.* Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, **99**(5): 859-867.
- [16] 李继耕. 叶绿体遗传与细胞质雄性不育性[J]. 中国农业科

- 学, 1983, **16**(1): 49-53, 97-98.
- LI J G. Chloroplast inheritance and cytoplasmic male-sterility [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1983, **16** (1): 49-53, 97-98.
- [17] 侯典云, 马占强, 徐 虹, 等. 小麦叶绿体 DNA 提取方法研究[J]. 河南农业科学, 2011, **40**(10): 38-40.
- HOU D Y, MA Z Q, XU H, *et al.* Study on extraction method of wheat chloroplast DNA [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2011, **40**(10): 38-40.
- [18] 侯泽豪, 张迎新, 王 欢, 等. 高温胁迫对小麦花药叶绿素质量分数及 RuBP 羧化酶基因表达的影响[J]. 西北农业学报, 2018, **27**(9): 1 280-1 286.
- HOU Z H, ZHANG Y X, WANG H, *et al.* Effects of high-temperature stress on chlorophyll mass fraction and RuBP carboxylase gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2018, **27**(9): 1 280-1 286.
- [19] 魏爱丽, 张英华, 黄 琴, 等. 小麦不同绿色器官光合速率与碳同化酶活性及其基因型差异研究[J]. 作物学报, 2007, **33**(9): 1 426-1 431.
- WEI A L, ZHANG Y H, HUANG Q, *et al.* Dynamic characteristics of photosynthetic rate and carbon assimilation enzyme activities of different green organs in different genotypes of wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, **33** (9): 1 426-1 431.
- [20] ISHII T, MORI N, OGIHARA Y. Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **103**(6-7): 896-904.
- [21] 李传友, 谢伟武, 孙兰珍, 等. 普通小麦三种细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的比较研究[J]. 遗传学报, 1995, (4): 272-279.
- LI C Y, XIE W W, SUN L Z, *et al.* The mtDNAs' RFLP analysis of three types of cytoplasmic male sterility in wheat [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1995, (4): 272-279.
- [22] 李继耕. 三个遗传系统及其相互渗透[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [23] 袁 健. 基因组重配与重组的分子进化研究[D]. 安徽芜湖: 安徽师范大学, 2014.
- [24] LI J G, LIU Y N. Chloroplast DNA and cytoplasmic male-sterility [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1983, **64** (3): 231-238.
- [25] 刘一农, 李继耕. 叶绿体 DNA(ctDNA)与细胞质雄性不育性[J]. 遗传学报, 1983, **10**(2): 114-122.
- LIU Y N, LI J G. Chloroplast DNA and cytoplasmic male sterility[J]. *Acta Genetica Sinica*, 1983, **10**(2): 114-122.
- [26] HE S, YU Z H, VALLEJOS C E, *et al.* Pollen fertility restoration by nuclear gene *F_rin* CMS common bean: an *F_rlink*-age map and the mode of *F_rin* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, **90**(7-8): 1 056-1 062.
- [27] 孙兰珍, 姚方印, 李传友, 等. 小麦 T、K、V 型胞质不育系和杂种 mtDNA 的 RAPD 分析及育性相关片段的克隆[J]. 作物学报, 2001, **27**(2): 144-148.
- SUN L Z, YAO F Y, LI C Y, *et al.* RAPD analysing of CMS-T, K, V mtDNAs and cloning of mtDNA fragments associated with CMS-K in wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, **27**(2): 144-148.
- [28] 焦 健, 高庆荣, 张爱民, 等. 不同小麦雄性不育类型光合、生理参数日变化的研究[J]. 作物学报, 2007, **33**(8): 1 267-1 271.
- JIAO J, GAO Q R, ZHANG A M, *et al.* Diurnal changes of photosynthetic and physiological parameters in different male sterile lines of wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, **33** (8): 1 267-1 271.
- [29] 焦 健, 高庆荣, 王大伟, 等. 不同小麦雄性不育类型光合速率的影响因子分析[J]. 中国农业科学, 2008, **41**(6): 1 622-1 629.
- JIAO J, GAO Q R, WANG D W, *et al.* Analysis on factors affecting photosynthetic rate in different male sterility lines of wheat [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, **41**(6): 1 622-1 629.
- [30] 吴世文, 张淑英, 高庆荣, 等. 不同细胞质小麦雄性不育系杂种 F₁ 光合生理参数的分析[J]. 麦类作物学报, 2009, **29** (2): 217-221.
- WU S W, ZHANG S Y, GAO Q R, *et al.* Study on photosynthesis and physiological parameters in hybrids with different cytoplasmic male-sterile wheat lines [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2009, **29**(2): 217-221.
- [31] 袁 凯, 高庆荣, 张保雷, 等. 不同细胞质小麦雄性不育系及杂种 F₁ 叶绿体的观察与比较[J]. 中国农业科学, 2012, **45** (10): 1 887-1 894.
- YUAN K, GAO Q R, ZHANG B L, *et al.* Observation and comparison of chloroplast structure in hybrid and different cytoplasmic male-sterile wheat lines [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, **45**(10): 1 887-1 894.

(编辑: 宋亚珍)