

紫花苜蓿雄性不育机理及其应用

张世超¹, 王英哲², 王志锋², 金艳¹, 陈晶晶¹, 徐博^{1*}

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林长春 130118; 2. 吉林省农业科学院, 吉林长春 130124)

摘要 阐述了紫花苜蓿雄性不育性的概况、紫花苜蓿的细胞质雄性不育的分子机理及雄性不育系国内外应用研究进展, 并展望了紫花苜蓿今后的研究趋势。

关键词 紫花苜蓿; 雄性不育系; 不育机理

中图分类号 S541+.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)11-0096-03

Male Sterile Line Mechanism and Application of Alfalfa

ZHANG Shi-chao¹, WANG Ying-zhe², WANG Zhi-feng², XU Bo^{1*} et al (1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130124)

Abstract We summarized the overview of alfalfa male sterility, molecular mechanism of cytoplasm male sterility and male sterile lines application research progress at home and abroad briefly, and put forward alfalfa development trend in the future.

Key words Alfalfa; Male sterile line; Sterile mechanism

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)最初从伊朗传入各国, 历史悠久, 无论在其他国家还是我国, 都是被广泛种植应用的优良牧草, 且是种植面积较大的人工牧草。紫花苜蓿因其产量高、蛋白质含量丰富、营养价值高、草种品质优良, 被称为“牧草之王”。紫花苜蓿只能异花授粉, 自交结实率低, 需要采用杂交方式来生产种子。紫花苜蓿有着很强的杂种优势, 但若要在生产中大规模利用紫花苜蓿的杂种优势, 则需要建立一套高效、安全的授粉控制系统, 而雄性不育是紫花苜蓿利用杂种优势的重要途径之一。紫花苜蓿的雄性不育也是蝶形花亚科植物花器官分化及发育的良好材料, 倍受各国学者的重视^[1-3]。目前, 我国对品质优秀的豆科牧草需求量逐年增加, 利用雄性不育特性获得杂种优势是培育优质苜蓿品种及其杂交制种的最有效方式^[4-5]。紫花苜蓿雄性不育系的开发为苜蓿育种做出了重要贡献, 在农业生产上是一种既经济又可以提供充足 F₁ 代种子的可行方法。

雄性不育的遗传机理近几年引起研究苜蓿的育种专家的广泛关注。在对紫花苜蓿繁殖特性的阶段性改良、种子产量的提高和杂种优势的利用等研究中, 紫花苜蓿雄性不育系的获得及遗传分析是不可或缺的, 是紫花苜蓿雄性不育遗传机理研究的前提和基础。鉴于此, 笔者综述了紫花苜蓿雄性不育性的概况、紫花苜蓿的细胞质雄性不育的分子机理及雄性不育系国内外应用研究进展, 并展望了紫花苜蓿今后的研究趋势, 旨在为紫花苜蓿遗传育种研究提供参考。

1 植物雄性不育的研究概况

植物在每一个阶段的进化发展中, 都会有多种多样的育性变异在发生, 其中包括雄性不育、自交不亲和等, 人们在植物改良上取得的重要进展离不开对这些变异的利用。在

1763 年, 雄性不育的现象就被 Kolreuter 初步观察发现。1876 年, Coleman 使人们接受“植物雄性不育”的观点并开始使用^[6]。造成植物雄性不育现象的原因是多种多样的, 无论是环境的恶劣还是疾病的发生或者基因的突变都可能成为雄性不育现象形成的因素。因为人们无法准确找到雄性不育现象发生的具体原因, 从而导致不确定性较多, 所以不同的雄性不育材料的表现形式也是多种多样的。

1.1 雄性不育的概念 雄性不育是在两性花中才会发生的现象, 主要表现为雄器官退化、产生畸形或者功能丧失, 影响了其花药、花粉及雄配子的正常形成与发育^[7]。迄今为止, 雄性不育的发现和应用在植物界已经非常常见, 植物界有 43 科 162 属 617 种均发现有雄性不育现象^[8]。雄性不育系作为遗传育种研究应用中的主要资源, 归因于其同时拥有自然条件下的生殖潜质和栽培状况下的育种价值。在发现不育系之前, 对于异花授粉和自花授粉作物, 人工去雄、化学杀雄等方法得到杂交种的常见手段, 但这样的方法生产成本高、劳资投入大, 并没有被广泛应用。而运用不育系做母本所得到的杂交种种子, 不仅使授粉和杂交过程简单化, 降低了成本, 而且提高了杂交种种子产量和制种效率, 并使杂交种的产量得到了保证, 不育系杂交种制种技术也因此正式走入人们的视线。对于花器小和雌雄同花的植物来讲, 利用雄性不育系这一杂种优势是最优选择。目前, 随着育种专家对植物雄性不育机理的深入探究, 通过雄性不育系获得杂交种的方式必将成为杂种优势利用的主要方式。

1.2 雄性不育的类型 Sears 因雄性不育材料基因型之间的不同表现, 将雄性不育分为 3 类, 即细胞质不育型、细胞核不育型和核质互作不育型, 即“三型学说”^[9]。Edwardson 将“三型学说”修改为“二型学说”, 即核不育型(GMS)和核质互作不育型(CMS)2 类^[10]。核质互作不育型也被称为细胞质雄性不育。

GMS 通常受单基因的调控, 不育基因的转化容易, 所以它的优点是育性相对稳定, 但由于找不到相应的保持系, 从而限制了其在生产制种中的应用。CMS 的不育性是由不

基金项目 国家自然科学基金项目(31402125); 国家国际科技合作专项(2015DFR30570-2); 公益性行业(农业)科研专项(201403048)。

作者简介 张世超(1991—), 女, 满族, 吉林吉林人, 硕士研究生, 研究方向: 牧草种质资源与遗传育种。* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事牧草种质资源与遗传育种研究。

收稿日期 2017-03-10

育的细胞质基因和相对应的核基因所决定的,比较容易找到保持系并进行“三系”配套,在生产应用上前景广阔。CMS在杂交育种上的成功很大程度归因于其育性恢复能力,在杂交过程中,当它与携带显性恢复基因的父本杂交时,就可恢复其部分育性。这在杂交育种上是十分重要的,但是大部分雄性不育系,其育性恢复能力的遗传结构尚不明确。

2 紫花苜蓿的细胞质雄性不育的分子机理

国内外研究学者均普遍认为线粒体基因组决定了高等开花植物细胞质雄性不育花粉败育的特征,并且受到核育性恢复基因(Rf)抑制或互作^[11]。线粒体的功能是依赖于核基因组和线粒体基因组共同作用的,线粒体基因组的重排、突变以及线粒体基因的剪切、编辑都可能引起细胞质雄性不育^[12]。线粒体基因恢复育性则依赖于核基因,核基因干扰了与CMS相关线粒体基因的功能;核基因组中存在CMS育性恢复基因,显性抑制CMS的表现^[13-16]。

近年来,序列相关扩增多态性(SRAP)、简单序列重复区间(ISSR)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单重复序列(SSR)等分子标记技术不断被成功应用于植物遗传多样性分析、遗传图谱构建和基因定位研究。而利用分子标记对植物细胞质雄性不育基因及其核恢复基因的分析 and 定位方面的研究也较多。Zhou等^[17]用SSR分子标记将T型恢复基因定位到1B染色体上。刘保申等^[18]采用SSR分子标记方法对其恢复系的恢复基因进行寻找,对这个恢复基因进行染色体定位后发现与4个SSR引物扩增位点有连锁关系,后计算出它们相应的遗传距离,这个发现对K型小麦细胞质雄性不育系恢复基因的标记辅助选择应用有重要意义。Sinha等^[19]利用SSR标记对小麦的F₂代分离群体进行遗传分析,并确定了Rf8的染色体定位并对该基因进行了精细定位。刘金兵等^[20]利用ISSR分子标记对甜椒的不育系和保持系进行分子标记,筛选到了与甜椒细胞质雄性不育基因连锁的分子标记。张春宝等^[21]利用大豆线粒体DNA开发了细胞质雄性不育材料的SCAR标记,并用于大豆细胞质不育系的筛选和不育系种子纯度鉴定,也进一步证明了植物中细胞质雄性不育花粉败育的特征是由线粒体基因组决定的。

关于紫花苜蓿细胞质雄性不育的恢复基因对其育性产生的影响是如何通过线粒体-核基因互作达到的,目前还处于初步研究阶段,因此迫切需要根据已有材料对紫花苜蓿细胞质雄性不育的恢复基因进行定位分析,为紫花苜蓿细胞质雄性不育恢复基因的精细定位、克隆和功能分析提供参考,进而为了解这一复杂的分子过程提供直接或间接的理论依据。

3 紫花苜蓿雄性不育系应用的研究现状

3.1 国外应用研究现状 1958年加拿大学者首次发现了紫花苜蓿雄性不育株20DRC^[22],然后找到了相对应的恢复系和保持系,配制杂种后F₁代的饲草产量高出对照30%以上^[23],美国、俄罗斯、匈牙利、保加利亚、法国等国的学者也相继培育出紫花苜蓿雄性不育系植株,并通过无数的杂交试验得到了良好的杂交种^[24]。人们对苜蓿雄性不育系的基础理

论研究是在20世纪80年代,英国、俄罗斯等国学者比较了苜蓿雄性不育系的不育和可育花粉的基因型^[25],分析了其不育类型和机制^[26]。在不育系的繁育研究方面,Tereshchenko等^[27]最早发现了紫花苜蓿细胞质雄性不育系的保持系,并组配杂交组合检验后代育性恢复状况,使得不育系种子的大量获得成为可能。Rosellini等^[28]采取了转基因的方式,成功培育出紫花苜蓿雄性不育植株,同时对其不育系的细胞学机理和相应的遗传分析两方面进行新的探究。但由于紫花苜蓿属于异花授粉植物,不育系无花粉,不能吸引昆虫传粉,使得杂种优势的利用和种子生产上也存在一些问题^[29]。美国Dairyland种子子公司利用其掌握的紫花苜蓿细胞质雄性不育系和保持系,于2001年最早推出了紫花苜蓿杂交种,并陆续推广上市了多个紫花苜蓿杂交种,研究显示紫花苜蓿杂交种在产量、抗旱性、整齐性等方面都有着非常优良的表现^[30]。这一成功经验表明了利用紫花苜蓿细胞质雄性不育系培育和繁育杂交种的可行性,为我国紫花苜蓿杂交品种的选育工作指明了方向。但是针对紫花苜蓿细胞质雄性不育的理论研究仍然较少,这是由于杂交种的生产涉及到一些商业秘密,从而限制了对其更加深入的探索。

3.2 国内应用研究现状 与国外相比,我国对苜蓿雄性不育系的研究相对较晚,1978年吴永敷教授从草原一号杂花苜蓿(*Medicago varia* Martin. cv. ‘Caoyuan No. 1’)中选育出3个部分不育株和3个完全不育株^[31]。有学者于1986年通过对细胞减数分裂过程的研究,在Ms-4植株和9个苜蓿品种的测交试验中发现F₁代群体中的雄性不育比例在2%~10%^[32]。不育系MS-4植株属完全不育类型,遗传性状稳定,适合育种生产。随后,用不育系Ms-4和40个优良苜蓿品种杂交^[33],筛选出的高产组合,和对照品种相比产量平均增加25.8%^[34]。自1998年以后,石凤翎等^[35]开始对苜蓿雄性不育系展开了更深入的研究。通过分析苜蓿雄性不育系及其F₁代不同时期叶子和花朵的同工酶发现,不育系Ms-4与可育系相比较,无论是酶带数量、酶活性等都存在差异,但由于杂种优势并不是在任何时期都能用同工酶检测到,所以在某些时期没有出现优势酶。学者们在对苜蓿雄性不育系的生殖生物学、花蕊细胞形态学和花蜜腺解剖学进行研究后^[36-37],为改善不育系花序短小、蜜腺分泌物等不良生殖性状,曾运用多次回交转育法得到育性分离后的不育株,建立相对稳定的苜蓿雄性不育系,发现不育植株的幼嫩茎段、叶片、叶柄可以作为诱导愈伤组织的外植体,从而找到了保存和繁殖不育系的方法^[38];通过PARD技术,获得了1个与苜蓿雄性不育系相关的分子标记,探索了苜蓿雄性不育性的分子鉴定方法,筛选到与苜蓿雄性不育性相关的基因片段,并利用它得到了3个F₁代不育系植株,14个回交一代不育系植株^[39]。

虽然我国学者对紫花苜蓿雄性不育系进行了较多研究,但多集中在细胞核不育机理方面,这对紫花苜蓿杂交新品种的选育工作推动不大。于洪柱等^[40]于2008年在公农1、2、3号紫花苜蓿卫星搭载后代中发现了紫花苜蓿雄性不育材料

的新成员 (MS - GN), 不育特性表现为无花粉或花粉败育。目前已获得稳定的紫花苜蓿雄性细胞质不育材料 4 份, 利用测交、回交方法, 初步选育出 3 份对细胞质不育性保持稳定的保持系育种材料, 后代不育率均高于 95%, 有广阔的理论研究和应用价值, 为进一步对苜蓿雄性不育系的利用提供了有效的前提条件。

4 苜蓿雄性不育系今后的研究趋势

紫花苜蓿在产量上取得重要突破的途径之一就是利用杂种优势, 国外的研究表明利用紫花苜蓿的细胞质不育系、保持系和恢复系进行“三系”配套, 辅以相应的制种方法, 进行商业制售杂交种是可行的。

尽管目前紫花苜蓿不育系的相关研究较多, 但在紫花苜蓿细胞质不育的研究方面仍存在一些问题。在国际上, 相关研究多集中于不育系多态性片段分析上, 在对紫花苜蓿细胞质不育的机理、核质互作机制方面研究不足, 而国内由于紫花苜蓿细胞质雄性不育材料的缺乏, 相关研究多集中于细胞核雄性不育机理方面; 缺乏系统的研究紫花苜蓿细胞质雄性不育的遗传基础和遗传模式, 使得进一步研究紫花苜蓿细胞质雄性不育恢复机制缺乏理论基础; 虽然群体分离分析法的发展、植物的细胞质雄性不育恢复基因的定位和克隆技术的进步及高质量紫花苜蓿的遗传图谱的构建都为紫花苜蓿的细胞质雄性不育恢复基因的克隆提供了依据, 但缺乏对于紫花苜蓿核质互作不育这一复杂分子过程的理论依据, 所以仍需要对紫花苜蓿细胞质雄性不育恢复基因的定位、克隆和功能分析等进行大量研究。

参考文献

- [1] 高翠萍, 石凤翎, 李红. 苜蓿雄性不育系 MS-4 雄蕊发育的细胞形态学研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2005, 36(2): 288-293.
- [2] 李晓霞, 金樑, 王晓娟. 几个紫花苜蓿亚(变)种花粉和胚珠遗传变异分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 1911-1917.
- [3] 伊凤艳, 石凤翎, 龙瑞才, 等. 苜蓿雄性不育植株与可育植株现蕾初期花蕾蛋白组比较[J]. 西北植物学报, 2013, 33(10): 1964-1971.
- [4] BRUMMER E C. Capturing heterosis in forage crop cultivar development[J]. Crop Sci, 1999, 39: 943-954.
- [5] LI H H, BRUMMER E C. Inbreeding depression for fertility and biomass in advanced generations of inter- and intraspecific hybrids of tetraploid alfalfa[J]. Crop Sci, 2009, 49(1): 13-19.
- [6] 李竞雄. 玉米雄性不育生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [7] 孟金陵. 植物生殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 147-199.
- [8] KAUL M L H. Male sterility in higher plants[M]. Belin: Springer-Verlag, 1988.
- [9] BOTU M, SARPE C, COSMULESCU S, et al. The genetic control of pollen fertility, pollenizing and fruit set for the *Prunus domestica* L. plum culticars[J]. Acta horticulturae, 2000, 577: 139-145.
- [10] 孙东发. 植物雄性不育新释: 变异基因假说(综述)[J]. 四川农业大学学报, 1993, 11(3): 457-462.
- [11] GAU M, OHKAWA Y, ISHIGE T. Mitochondrial DNA variation among alfalfa (*Medicago sativa* L. and *M. falcata* L.) cultivars and cytoplasmic male sterile line[J]. Journal of Japanese society of grassland science, 1988, 34(3): 149-156.
- [12] CHASE C D. Cytoplasmic male sterility: A window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions[J]. Trends in genetics, 2007, 23(2): 81-90.
- [13] MONÉGER F, SMART C J, LEAVER C J. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene[J]. EMBO J, 1994, 13(1): 8-17.

- [14] ABAD A R, MEHRTENS B J, MACKENZIE S A. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean[J]. Plant cell, 1995, 7(3): 271-285.
- [15] DILL C L, WISE R P, SCHNABLE P S. *Rf8* and *Rf* mediate unique T-*ur*-*f3*-transcript accumulation, revealing a conserved motif associated with RNA processing and restoration of pollen fertility in T-cytoplasm maize[J]. Genetics, 1997, 147(3): 1367-1379.
- [16] LEÓN P, ARROYO A, MACKENZIE S A. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants[J]. Annual review of plant biology, 1998, 49: 453-480.
- [17] ZHOU W C, KOLB F L, DOMIER L L, et al. SSR markers associated with fertility restoration genes against *Triticum timopheevii* cytoplasm in *Triticum aestivum*[J]. Euphytica, 2005, 141(1): 33-40.
- [18] 刘保申, 孙其信, 高庆荣, 等. K 型小麦细胞质雄性不育系育性恢复基因的 SSR 分子标记分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(4): 354-358.
- [19] SINHA P, TOMAR S M S, VINOD, et al. Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene *Rf8* for *Triticum timopheevii* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers[J]. Genetica, 2013, 141(10/11/12): 431-441.
- [20] 刘金兵, 王述彬, 潘宝贵. 甜椒 CMS 不育基因 ISSR 的分子标记[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(3): 607-609.
- [21] 张春宝, 李玉秋, 彭宝, 等. 线粒体 ISSR 与 SCAR 标记鉴定大豆细胞质雄性不育系与保持系[J]. 大豆科学, 2013, 32(1): 19-22, 27.
- [22] 吴永敷. 国外对于苜蓿细胞质雄性不育系的研究概况[J]. 草原与草坪, 1984(2): 6-8.
- [23] 吴永敷, 特木尔布和, 许占有, 等. 苜蓿雄性不育系杂交制种利用的研究[J]. 中国草地, 1998(5): 9-12.
- [24] SINSK J. Research on the expression of male sterility in F1 lucerne hybrids[C]//Report of the twenty-eighth alfalfa improvent conference. California: University of California, USA, 1982: 13-16.
- [25] ANDO S, MASUDA S, TAKAHASHI C, et al. Intravarietal differences in mitochondrial DNAs of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Japanses journal of breeding, 2010, 45(2): 227-228.
- [26] VIANDS D R, SUN P, BARNES D K, et al. Pollination control: Mechanical and sterility[J]. Agronomy, 1988, 29: 931-960.
- [27] TERESHCHENKO N M, PETKOV V V. Seed production of male-sterile and fertile clones of Lucerne[J]. Selektsiya I Semenovodstvo, 1980, 2: 17-18.
- [28] ROSELLINI D, PEZZOTTI M, VERONESI F. Characterization of transgenic male sterility in alfalfa[J]. Euphytica, 2001, 118(3): 313-319.
- [29] GYULANASYROV G, GYULANASYROVA Z. Heterosis breeding in lucerne-problems and prospects[J]. Plant science, 2005, 42(2): 111-117.
- [30] VELDE M. Strategies for alfalfa breeding: What is the next step? [C]//Proceedings of the 2005 Idaho Alfalfa and Forage Conference. Idaho, USA: [s. n.], 2005: 22-24.
- [31] 吴永敷. 苜蓿雄性不育系的选育[J]. 中国草原, 1980(2): 36-38.
- [32] 冯瑞光, 孟令启, 宁文书, 等. 硬型光敏核不育系主要农艺性状的配合力及杂种优势[J]. 华北农学报, 1997, 12(4): 7-12.
- [33] 许占友. 苜蓿杂种优势测定的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 1994: 22.
- [34] 吴永敷, 特木尔布和, 许占有, 等. 苜蓿雄性不育系杂交制种利用的研究[J]. 中国草地, 1998(5): 9-12.
- [35] 石凤翎, 吴永敷, 布和, 等. 苜蓿雄性不育系及其杂种 F1 代同工酶分析[C]//首届中国苜蓿发展大会论文集. 北京: 中国草原学会北京市农村工作委员会, 2001: 62-65.
- [36] 石凤翎, 李红, 周丽梅, 等. 影响苜蓿雄性不育系杂交制种产量因素的分析[J]. 内蒙古农业大学学报, 2000, 21(1): 85-90.
- [37] 石凤翎, 吴永敷, 王明玖, 等. 苜蓿雄性不育系的生殖特性及其分子遗传基础[C]//21 世纪草业科学展望: 国际草业(草地)学术大会论文集. 北京: 《中国农学通报》期刊社, 2001: 33-333.
- [38] 高翠萍, 石凤翎, 孙静. 苜蓿雄性不育系组织培养技术的研究[J]. 中国草地学报, 2006, 28(5): 29-32.
- [39] 高翠萍, 石凤翎, 云锦凤, 等. 苜蓿雄性不育系 Ms-4 及其杂交后代不育基因 RAPD 分子标记[C]//2008 中国草业发展论坛论文集. 厦门: [出版者不详], 2008: 262-266.
- [40] 于洪柱, 徐安凯, 栾博宇, 等. 紫花苜蓿雄性不育系的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(17): 81-82.