

## 综述 Reviews

## 水稻细胞质雄性不育及育性恢复研究进展

刘石锋<sup>1</sup>, 陈倩<sup>1</sup>, 洪广成<sup>1</sup>, 胡骏<sup>2</sup>, 秦小健<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>重庆师范大学生命科学学院, 植物环境适应分子生物学重庆市重点实验室, 重庆401331<sup>2</sup>武汉大学生命科学学院, 杂交水稻国家重点实验室(武汉), 武汉430072

**摘要:** 植物细胞质雄性不育(CMS)是广泛存在于自然界中的现象, 主要表现为不能产生有功能的花粉从而导致不能正常受精结实自然现象。CMS的起因源于受植物细胞质基因的影响表现出雄性不育的特征, 目前研究表明为线粒体的基因引起的雄性不育。相应地, 细胞核中存在某类基因能够编码一种蛋白使其育性得以恢复, 这一类基因称为育性恢复基因(*Rf* genes)。杂交水稻的生产依赖于CMS的发掘和利用, 并且这也是农作物增产的一条有效途径。迄今为止, 水稻中CMS和育性恢复的相关研究较多, 机理阐述相对比较深入, 本文主要介绍水稻CMS及育性恢复基因的研究及CMS和育性恢复机理的最新研究进展, 希望能为揭示水稻CMS与育性恢复机制以及其他作物的CMS/*Rf*研究提供参考, 为新型杂交水稻的培育提供新思路。

**关键词:** 细胞质雄性不育; 育性恢复; 核质互作; 分子机制

水稻(*Oryza sativa*)是人类最重要的粮食作物之一, 约占全球粮食作物种植面积的1/3, 水稻的稳产与高产直接关系到全球社会的稳定与发展。杂交水稻的生产依赖于雄性不育的发现和利用, 长期以来, 雄性不育是科学家们进行农作物育种的重要工具; 利用雄性不育材料选育出了一些革命性的新农物品种, 具有很强的杂种优势, 能够很大程度上提高农作物的产量, 从而保证世界人口的粮食安全问题。以雄性不育为基础的两系、三系杂交农作物已经表现出很强的杂种优势, 据统计, 水稻、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)和油菜(*Brassica napus*)等农作物利用雄性不育材料进行杂交种生产能够把产量提升15%~50% (Li等2007; Tester和Langridge 2010)。细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)材料在杂交育种生产中应用得最为广泛, 对水稻来讲, 我国最开始的杂交水稻育种就是从细胞质雄性不育系开始, 寻找保持系和很强的恢复系实现三系配套, 在杂交水稻的生产中发挥了巨大作用; 随着后来水稻光温敏核不育系的发现及利用, 开始了两系杂交稻的配套和生产, 增加了杂交水稻育种的新途径, 保证了国家的粮食安全。此外, CMS能够被核基因所编码的蛋白质恢复, 这一类基因我们称为恢复基因(restorer of fertility, *Rf*) (Budar等2003)。对恢复基因的研究有助于我们更深入地了解其恢复机理, 更重要的是能够在了解恢复机制的基础上培育新

型的细胞质不育系和很强的恢复系, 使杂交水稻能够不断地创新和发展。因此, 开展雄性不育与育性恢复机制的研究对于了解水稻、培育水稻和人类社会具有战略性的意义。

## 1 水稻CMS及其机理的研究进展

## 1.1 水稻CMS基因的研究

CMS这种自然现象是以母性遗传为特征的, 产生的原因主要是植物线粒体的基因组中存在嵌合基因表达导致线粒体的正常功能紊乱, 从而使植物雄性配子发生败育(Hu等2012)。杂交水稻的发展依赖于水稻细胞质雄性不育系的发掘和利用, 一般情况下, 具有CMS的细胞质(sterility, S)在细胞核中对应的恢复基因为 $rrrf$ , 不能对其S型的细胞质实现恢复, 而正常的细胞质(normal, N)及核内相对应的恢复基因 $rfrf$ 能够产生正常的雄配子, 但是, 通过杂交同样不能恢复CMS系的育性。这样的材料能够保持CMS系的不育性状, 可被当成保持系(maintainer line)使用。此外, 细胞质为N且核内相对应的恢复基因为 $Rf/Rf$ 的材料和细胞质雄性不育系做杂交时才能恢复其育性, 这样的材料能作为恢

收稿 2017-06-26 修定 2017-12-01

资助 国家重点研发计划(2016YFD0100706)、重庆师范大学人才启动基金(16XLB018)和重庆市教委科学技术研究项目(KJ1600310)。

\* 通讯作者(qinxiaojian@cqnu.edu.cn)。

复系使用。这种由三种系组成的模式就是三系杂交水稻生产的基础(图1)。

在植物界中, CMS存在不同的类型, 加之植物线粒体基因组的变异很大, 种类可谓十分丰富。CMS在不同的物种中存在很大的差异, 甚至在同一物种中也会因败育时期不同而存在异同。不同的CMS类型, 其雄性生殖器官(主要是花粉)的发育及形态特征都存在差异, 因此, 花粉是我们研究CMS的主要对象。借助细胞生物学、分子生物学和遗传学等现代生物学方法研究CMS的花粉发育过程, 对我们从深层次认识CMS以及CMS的形成机理有很大的指导作用。

### 1.1.1 水稻CMS基因的鉴定和特征

植物CMS基因是导致花粉败育的主要因素, 一般认为雄性不育基因能够编码某种影响小孢子发育的蛋白质最终引起雄性不育现象(Bentolila等2002; Chen和Liu 2014; Hu等2012)。目前水稻中存在的CMS主要分为5类, 不同类型的不育基因已有研究报告(表1)。

如表1所示, 根据目前的研究发现水稻CMS基因都来自于线粒体基因组的重组过程, CMS的基因往往都会与线粒体呼吸链的功能基因嵌合在一起, 形成一个共转录的不育基因转录本。不同的物种线粒体的重组过程中产生了不同的 $orf$ 基因与呼吸链的基因嵌合在一起, 就算在同一物种中, 不同的CMS类型也是通过重组产生了不同的 $orf$ 基因(Bailey-Serres等1986; Campbell和Barker 1998; Macey等1997)。大多数植物的CMS基因序列包含一些线粒体的功能基因序列, 然而最近克隆的一些CMS基因, 例如野生败育细胞质雄性不育(wild abortive cytoplasmic male sterility, WA-CMS)基因 $WA352$ 和 $orf352$ 都来自其他的一些线粒体 $orf$ 基因(Luo等2013)。

目前CMS基因鉴定的方法很多, 一般最常用的方法是通过线粒体基因在结构上的差异性以及通过基因组、转录组、蛋白质组等高通量技术对细胞质雄性不育系在存在或者不存在恢复基因的情况下分析其两种类型的线粒体, 然后全面分析

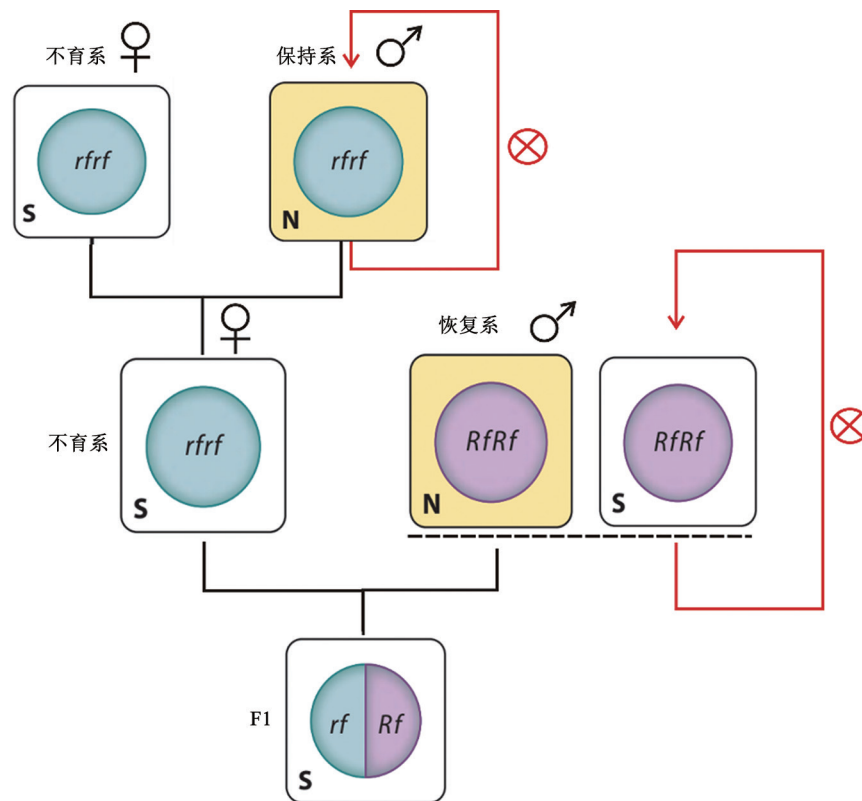


图1 应用细胞质雄性不育系进行三系杂交稻生产示意图

Fig.1 Application of cytoplasmic male sterile line for three-line hybrid rice production  
根据Chen和Liu (2014)并略有修改。

表1 水稻CMS类型及相关基因

Table 1 CMS types and related genes in rice

类型	相关基因	相关蛋白特征	参考文献
BT-CMS (G)	B- <i>atp6-orf79</i>	膜蛋白	Akag 2004
HL-CMS (G)	<i>atp6-orfH79</i>	膜蛋白	Wang等2013
WA-CMS (S)	<i>rpl5-WA352</i>	膜蛋白	Luo等2013
LD-CMS (G)	L- <i>atp6-orf79</i>	不清楚	Itabashi等2011
CW-CMS (G)	<i>orf307</i>	不清楚	Fujii和Toriyama 2009

BT-CMS: 包台型细胞质雄性不育; HL-CMS: 红莲型细胞质雄性不育; WA-CMS: 野生败育细胞质雄性不育; LD-CMS: Lead水稻型细胞质雄性不育; CW-CMS: 中国野生稻型细胞质雄性不育; G: 配子体雄性不育类型; S: 孢子体雄性不育类型。表2同。

其在DNA、RNA及蛋白质层面存在的差异, 并对差异较大的基因进行候选验证, 最终鉴定出CMS基因(Chen和Liu 2014)。水稻WA-CMS不育基因的克隆就是通过合成覆盖整个线粒体基因组的43个探针对野生败育细胞质雄性不育系、保持系及恢复系(*Rf3*或*Rf4*)进行大量的RNA杂交分析, 发现一条特异的转录本在不育系中的表达量很高而在恢复系中的表达量很低, 经过对这个转录本进行序列分析, 发现、鉴定到一个开放阅读框(orf), 该阅读框即为WA-CMS不育基因*WA352* (Luo等2013; Tang等2014)。包台型细胞质雄性不育(Chinsurah Boro II-type cytoplasmic male sterility, BT-CMS)相关基因是在1994年通过Southern杂交的方法分析线粒体基因发生的重组事件时发现的: 在包台型细胞质雄性不育系线粒体中*Atp6*基因附近存在线粒体DNA片段和BT-CMS的不育性状相关联, 随后对BT-CMS、恢复系和杂种F1 *Atp6*基因附近的序列进行全面分析, 发现下游存在一段特异的DNA片段在包台型细胞质雄性不育系中有, 而在恢复系中没有, 进一步通过序列及转录水平的分析, 发现嵌合在*Atp6*基因下游的序列存在一个orf能够编码一段含有79个氨基酸的蛋白质, 进一步验证得出该基因即为BT-CMS的不育基因*orf79* (Akagi等1994; Wang等2006)。红莲型细胞质雄性不育(Honglian cytoplasmic male sterility, HL-CMS)系是武汉大学科研人员利用海南红芒野生稻(*Oryza rufipogon*)与江西的地方水稻品种‘莲塘早’杂交, 再经过多代的回交于1974年育成的不育性状稳定的水稻CMS类型, 并且‘莲塘早’可以作为其保持系(黄文超等2012)。随后, 经过对红莲型细胞质雄性不育系、保持系和杂种F1的线粒体基因组进行限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length poly-

morphism, RFLP)分析, 发现多个基因的区域附近存在差异(李小明等2000)。后来, 易平等(2002)在此基础上利用Southern杂交技术发现线粒体*atp6*基因片段存在差异, 以在DNA和RNA水平上均有差异的*atp6*基因为探针, 通过筛选不育系和保持系的线粒体基因组文库, 鉴定到了HL-CMS的不育候选基因*orfH79*; 通过后来的转基因验证和分析证明了该基因确实能够引起花粉的败育(Peng等2010)。Lead水稻型细胞质雄性不育(Lead Rice-type cytoplasmic male sterility, LD-CMS)的不育基因与BT-CMS类似, 利用同源克隆的办法将其鉴定出来, 其不育转录本为L-*atp6-orf79*。中国野生稻型细胞质雄性不育(Chinese wild rice-type cytoplasmic male sterility, CW-CMS)的不育基因是一个新的开放阅读框*orf307*, 不与线粒体内的其他的功能基因共转录形成不育转录本。最后两种类型CMS不育基因的研究相对比较浅。

### 1.1.2 水稻花粉发育与CMS的研究

到目前为止, 植物CMS候选基因已经通过高通量的基因组、转录组、蛋白质组等技术被大量发现, 并且在不同的农作物中CMS基因一般都与线粒体的一些功能基因嵌合转录与表达, 从而导致雄性不育。不能产生有功能的花粉是植物CMS最显著的特征, 人类正是利用CMS材料的这个特征通过杂交得到杂种F1代, 其在产量、生长、代谢等方面都表现出比双亲更强的优势。利用水稻细胞质雄性不育系进行杂交种的制备省去了人工去雄的繁琐步骤, 并且能得到比较纯的杂种F1代, 尤其是在农作物杂种制备中显得更为重要。利用细胞形态学观察水稻花粉的发育过程, 可将CMS分为无花粉型、典败型、圆败型、染败型。

无花粉型CMS顾名思义是植株不能直接产生



花粉,在光学显微镜下看不到花粉颗粒,这种类型的CMS一般是在花粉发育的减数分裂时期异常引起的花粉败育,主要原因是由于小孢子母细胞粘连、液泡化,不能正常进行减数分裂,或者胞质分裂不正常产生四分体,最终细胞发生异常,没有花粉形成(彭海峰等2006)。典败型CMS主要是以单核期败育为主,但也有少部分发生在花粉母细胞增殖和减数分裂时期,少数还发生在二核期(朱英国1979)。这种类型的不育系比较稳定,在生产上被大面积用来生产杂交种,例如野败型CMS水稻在生产上大面积制种应用(Das等2010; Luo等2013)。圆败型CMS的花粉在败育时期上比典败型晚,一般是由单核期经有丝分裂形成二核花粉后发生的败育,也就是到二核期时花粉发育不能正常完成,整个发育过程停止。这类花粉通过碘-碘化钾(I<sub>2</sub>-KI)染色表现为花粉圆形中空,不能着色,很少有淀粉积累(Hu等2012; 黄文超等2012; 朱英国1979)。染败型CMS的败育发生在三核期,是由二核花粉进行有丝分裂形成三核花粉后发生的败育;经过对花粉的细胞形态学观察发现,其为圆形花粉粒, I<sub>2</sub>-KI染液染色为浅蓝色,有部分淀粉积累(Wang等2006)。染败型CMS的代表有BT-CMS、CW-CMS型水稻等。花粉发育是植物最重要的生殖生长过程,植物CMS归根结底就是花粉发育的问题,不同的时期发生败育产生不同的败育类型,表现出不同的花粉败育特征。除了以上的分类方法外, CMS还可分为孢子体雄性不育(sporophytic)和配子体雄性不育(gametophytic)两种类型。一般认为花粉单核期及以前发生的败育为孢子体类型,花粉育性只与孢子体基因型相关,而与雄配子的基因型无关。

## 1.2 水稻CMS机理研究进展

水稻的杂种优势主要是基于CMS材料的利用展开的。可以说, CMS是杂种优势利用的核心,挖掘和开发新型的水稻CMS材料也是植物杂种优势发展的一种手段。此外,针对水稻CMS基因的不育机理展开研究是十分必要的,对我们深入认识CMS和为新型CMS细胞质的培育提供了一定的理论基础,也为杂交水稻的发展奠定了基础。

目前认为, CMS基因的*orf*一般来自于线粒体基因组的重组过程,不育基因的基因组片段能与线粒体功能基因嵌合成一条共转录本,然后不育基因编码的蛋白质就能在线粒体内表达,从而引

起线粒体功能的紊乱,导致花粉发育过程受阻。目前,不育基因编码的蛋白质为什么会特异地影响小孢子的发育还不是很清楚,但是存在3种可能的情况:(1) CMS基因特异地在花药组织中转录和翻译蛋白从而影响花粉发育;(2) CMS基因在整个组织中都转录但是只在花药中积累蛋白质;(3) CMS基因在整个组织中都转录和表达。前两种情况对于解释水稻CMS基因特异影响花粉发育过程较为合理。但是到目前为止,大部分鉴定到的CMS基因在各个组织中均有表达,例如水稻HL-CMS的不育基因*orfH79*在水稻的各个组织中都存在表达(Peng等2010; Wang等2013)。WA-CMS基因*WA352*在所有组织中转录,但*WA352*蛋白特异性地在绒毡层和小孢子母细胞中大量积累(Luo等2013)。迄今为止,大量研究表明关于CMS基因引起的CMS机理假说可以归纳为4个方面。

### 1.2.1 细胞毒性机理假说

该假说认为CMS基因能够编码一种对线粒体具有毒害作用的产物,这种CMS的产物引起线粒体功能紊乱。目前,在已经鉴定的CMS基因中,有部分CMS基因产物经过研究证明确实能够支持这种假说,例如水稻BT-CMS的ORF79和WA-CMS的*WA352*对大肠杆菌(*Escherichia coli*)也有毒性作用,能够抑制大肠杆菌的生长(Chen和Liu, 2014; Luo等2013; Wang等2006)。HL-CMS基因*orfH79*编码的蛋白质ORFH79在大肠杆菌中表达时对大肠杆菌的生长有明显的抑制作用,也表现出了和其他的CMS基因产物类似的毒性作用(Peng等2010)。

### 1.2.2 能量供应不足假说

该假说认为植物CMS起源于线粒体的缺陷,而CMS基因正是导致线粒体缺陷的直接因素。能量供应不足假说提出CMS基因的产物破坏了线粒体产生ATP的正常功能,导致能量供应不足,影响小孢子的正常发育从而导致败育。众所周知,植物在整个生长过程都需要大量能量,而线粒体正是能量产生的主要场所,在植物的生长发育过程尤其是生殖生长过程中尤其重要(Almeida等2002)。研究发现,在花粉发育过程中,线粒体是非常活跃的,会在关键的发育时期供应大量的ATP (Asahi等1969; Garcia等2014; Scott和Logan 2008)。水稻HL-CMS的ORFH79和BT-CMS的ORF79都是线粒体呼吸链结合的膜蛋白,这些CMS基因产物通过

与线粒体的内膜结合对呼吸链的电子传递以及质子通道进行干扰, 导致在花粉发育过程最需要能量的时候产生缺陷, 导致花粉败育(Chen和Liu 2014; Wang等2013)。

### 1.2.3 非正常的细胞程序性死亡模型

非正常的细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)模型认为PCD对生物有机体来说是很正常的自然现象, 植物在生长代谢中也需要选择性地对细胞进行凋亡从而加速机体自身更新, 假如出现非正常的PCD过程势必会影响个体甚至花粉的发育过程最终导致雄性不育的产生, 如水稻中WA-CMS的不育蛋白WA352特异地在绒毡层表达并和线粒体呼吸链COX11相互作用造成细胞色素c的释放, 引起绒毡层不正常凋亡从而导致败育(Luo等2013)。

### 1.2.4 反向信号调控模型

该模型主要是通过线粒体与细胞核之间的逆向调控来解释CMS的机理, 模型认为线粒体的不育基因会产生信号来调节细胞核基因的表达进而控制CMS基因在线粒体中的表达。目前, 符合这一假说的类型并不多, 如CW-CMS的ORF307就是通过调节恢复基因*RF17*的表达来开启败育开关的, 恢复基因并没有对不育基因*orf307*在转录和蛋白水平进行加工(Fujii和Toriyama 2009)。

总之, 不管CMS基因通过哪一种途径对小孢子的发育产生影响, 其间都存在一定联系, 从复合体、能量、毒性、信号等方面都离不开线粒体呼吸链复合体的工作状态, 与线粒体呼吸链的5个复合体都存在相关性。

## 2 水稻CMS育性恢复机理的研究进展

### 2.1 水稻CMS育性恢复基因的研究

植物CMS与育性恢复是存在于大多数高等植

物中的一对“孪生兄弟”, 密不可分, 同时也是研究细胞质与细胞核相互作用和共同进化最好的材料。高等植物的线粒体基因组是十分活跃的, 能够不停重组产生新的基因组排列方式(Asahi 1996)。相对地, 在细胞核中也存在能够应付线粒体基因组高可变性的核编码基因, 其能在一定程度上消除线粒体重组带来的不利影响(Touzet和Meyer 2014)。目前许多研究表明, CMS基因产生后, 有对应的核基因编码蛋白质对细胞质的不育基因在不同水平上进行阻止, 以消除不育基因带来的影响, 这一类基因称为恢复基因(Bentolila等2002; Chase 2007)。迄今为止, 在不同的植物中发现、定位和克隆的恢复基因已有十多个, 水稻中的恢复基因大概占了一半(Chen和Liu 2014) (表2)。

目前, 水稻是CMS育性恢复基因克隆较多也是恢复机理研究较为深入的农作物。水稻BT-CMS的恢复基因*Rf1*是第一个配子体雄性不育恢复基因, 它的成功克隆是基于早期的大量克隆群体的构建, 通过原始的图位克隆方法得到的。BT-CMS恢复基因*Rf1a*和*Rf1b*分别编码长度为791和506个氨基酸的PPR蛋白, 分别包含18和11个PPR结构域, 并且都是定位到线粒体的候选蛋白。WA-CMS细胞质是在生产上应用得最为广泛的细胞质类型, 但是恢复基因的克隆相对较晚, 两个恢复基因*Rf3*和*Rf4*分别定位在1和10号染色体上(Zhang等1997; 张群宇等2002), 但关于其克隆再未见报道。直到2014年, 一个编码PPR蛋白的基因*Rf4*才被成功克隆, 该基因经原生质体转化试验发现定位到线粒体, 对WA-CMS的转录本进行加工, 降低WA352的积累, 但是具体的加工方式尚不清楚(Tang等2014)。HL-CMS恢复基因为双恢复基因*Rf5*和*Rf6*(Zhang等2017), 目前*Rf5*已经被克隆并且展开了进一步的机理研究(Hu等2012), *Rf6*也已被定位和克

表2 水稻CMS恢复基因

Table 2 Restorers of fertility for CMS in rice

类型	恢复基因	恢复蛋白特征	参考文献
BT-CMS (G)	<i>Rf1a</i> 和 <i>Rf1b</i>	三角状五肽重复结构蛋白(PPR)	Wang等2006
HL-CMS (G)	<i>Rf5</i> 和 <i>Rf6</i>	三角状五肽重复结构蛋白(PPR)	Hu等2012
WA-CMS (S)	<i>Rf3</i> 和 <i>Rf4</i>	三角状五肽重复结构蛋白(PPR)	Tang等2014
LD-CMS (G)	<i>Rf2</i>	富含甘氨酸蛋白	Itabashi等2011
CW-CMS (G)	<i>Rf17</i>	酰基转运蛋白合成酶	Fujii和Toriyama 2009

隆(Huang等2011, 2015), 它们都属于PPR家族基因。CW-CMS的恢复基因克隆相对而言较难, 是因为CW-CMS的败育特征比较特殊, 花粉败育发生在三核期, 经过碘液染色看不出太大的差异, 其主要特征是花粉在柱头上不能萌发导致的败育, 是属于配子体雄性不育的一种类型; 其恢复基因 $RF17$ 编码了含有178个氨基酸的蛋白质, 含有一个类酰基蛋白合成酶结构域, 目前CW-CMS育性恢复机理研究尚不清楚(Fujii和Toriyama 2005)。LD-CMS型水稻的花粉败育时期和CW-CMS型一样, 也是三核期败育早期, 属于配子体雄性不育类型。早期的遗传关联分析发现, LD-CMS恢复基因 $Rf2$ 定位在2号染色体, 并且育性的恢复是单基因恢复模式(笹原健夫和勝尾清1965)。该基因编码一个富含甘氨酸的蛋白质, 其恢复机理尚不知晓。

## 2.2 水稻CMS育性恢复机理的研究

众所周知, 线粒体呼吸链的几个大复合物是由一些线粒体自身的基因和核基因共同编码的蛋白组成的, 是一个半自主的细胞器。此外, CMS基因产生阻碍小孢子发育的产物能够被植物中的PPR蛋白特异地定位到线粒体中对其产生的影响进行清除, 这就是育性恢复的过程。迄今为止, 有关水稻的育性恢复机理的研究在植物育性恢复研究方面相对来说比较深入, CMS育性恢复的机制主要有4个方面。

### 2.2.1 基因组水平育性恢复

高等植物的线粒体基因组结构和大小差异性很大, 并且极不稳定, 线粒体的重组比较频繁, 可能会产生新的 $orf$ 基因(Mackenzie和McIntosh 1999)。某些CMS的性状也许在线粒体的自我变异过程中能得到恢复, 比如, 编码CMS基因的基因组片段从主环迁移到亚化学计量的状态, 使不育基因不能表达或者表达量很低从而实现育性的恢复。这种在基因组水平上实现育性恢复的研究例子在水稻中尚未报道。

### 2.2.2 不育基因转录后水平恢复

目前, 水稻恢复基因在RNA水平加工不育基因的转录本消除不育基因带来的影响的例子比较多, 也是目前研究得比较深入的恢复类型, 例如水稻中BT-CMS的B- $atp6-orf79$ 就是通过 $RF1A$ 切割共转录本的连接区和 $RF1B$ 降解不育转录本使 $orf79$

不能被编码(Wang等2006)。HL-CMS的恢复和BT-CMS的恢复模式相似, PPR蛋白 $RF5$ 能够对共转录本 $atp6-orfH79$ 实现切割, 但是并不是直接切割的因子, 而是需要 $GRP162$ 和 $RFC3$ 等蛋白因子以复合体的形式进行(Hu等2012; Qin等2016)。此外, PPR蛋白 $RF6$ 对共转录本 $atp6-orfH79$ 的加工也不是单独进行的, 而是需要互作蛋白 $HXK6$ 形成复合体来实现不育转录本的切割(Huang等2015)。这种不同的加工方式可能是因为序列之间的多样性造成的。在水稻WA-CMS中, 恢复蛋白 $RF4$ 通过降解的方式对 $rpl5-WA352$ 进行加工恢复育性(Tang等2014)。

### 2.2.3 不育基因翻译或翻译后水平恢复

在一些CMS/ $Rf$ 的系统中, 恢复基因对不育转录本并没有影响, 而是在翻译和翻译后进行调控。水稻WA-CMS的恢复蛋白 $RF3$ 并不影响 $WA352$ 的转录水平, 而是在蛋白质的层面上降低 $WA352$ 在花药中的积累。HL-CMS的恢复复合体成员 $GRP162$ 融合导肽进入线粒体后结合不育转录本, 通过抑制 $ORFH79$ 的表达来恢复育性(Hu等2013)。总之, 属于这种类型恢复方式的在不育基因转录水平上都没有差异, 而是通过抑制不育相关蛋白的积累来实现CMS的育性恢复。

### 2.2.4 不育基因在代谢通路上的恢复

水稻中从代谢途径上实现育性恢复的报道目前非常少, 仅有T型玉米的恢复基因 $Rf2$ 编码了一个乙醛脱氢酶, 能够阻断不育的信号通路恢复育性(Wise等1999)。

到目前为止, 水稻BT-CMS、WA-CMS和HL-CMS的恢复机制研究已较为深入, 而LD-CMS和CW-CMS的恢复机制尚需进一步研究。总之, 不管以何种模式恢复, 水稻CMS育性恢复的分子机制都尚需进一步揭示, 通过机制的揭示为水稻杂种优势的利用奠定一定理论基础。

## 3 总结与展望

水稻是我国主要的粮食作物, 是我国60%以上人口的口粮, 粮食安全直接关系到国民经济的发展。杂交水稻的生产依赖于细胞质雄性不育系的挖掘和培育, 加强CMS育性恢复机理的研究, 对于更好地利用雄性不育的细胞质和推进三系杂交稻育种意义重大, 同时, 大量开展CMS和育性恢复



的研究对于更加深入地认识细胞质和细胞核之间的相互作用关系有很大的促进作用。目前, 有关水稻CMS基因的挖掘和相应的研究机理已有不少报道, 尤其对于水稻BT-CMS、WA-CMS和HL-CMS的不育基因及其作用机理的研究都比较深入, 使我们在之前初步的认识基础上又更进一步, 这对于雄性不育系的选育和创制新型的不育系提供了可能(Hu等2013; Chen和Liu 2014; Luo等2013; Wang等2006; Peng等2010)。水稻LD-CMS和CW-CMS不育基因的研究与其他类型CMS相比相对比较浅显不够深入, 但是也在不同程度上揭示了相关的不育机理(Fujii和Toriyama 2009; Itabashi等2011)。在水稻CMS的育性恢复机制方面, 相关的研究也越来越深入。水稻BT-CMS的恢复机制是通过RF1A切割共转录本的连接区和RF1B降解不育转录本使*orf79*不能被编码(Wang等2006)。WA-CMS的育性恢复主要是通过恢复蛋白RF4降解的方式来对*rpl5-WA352*进行加工恢复育性(Tang等2014)。HL-CMS的育性恢复研究相对较为深入, 其恢复蛋白RF5和RF6分别通过招募其他的育性恢复复合体来行使育性恢复的功能, 目前相关的互作因子都已被鉴定并且两个基因都有各自独立的途径来实现不育转录本的加工(Hu等2012; Huang等2015; Qin等2016)。对于LD-CMS和CW-CMS, 由于在生产实践上应用有限, 所以其不育和育性恢复的机理研究相对较浅。总之, 对水稻不育基因的发掘和机理研究能够对杂交水稻不育系的选育提供一定的理论基础, 同时可用于在生产实践当中选育优良的不育系服务于水稻育种。加强水稻育性恢复机制的研究可以在一定程度上拓宽恢复系的选育, 优良的恢复系可用于杂交种的生产。加强CMS育性恢复机理的研究对于杂交水稻的发展具有很重要的意义。同时, 开展CMS和育性恢复的研究对于更加深入地认识细胞质和细胞核之间的相互作用关系也将有很大的促进作用。

#### 参考文献(References)

- Akagi H, Nakamura A, Yokozeki-Misono Y, et al (2004). Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor Appl Genet*, 108 (8): 1449–1457
- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al (1996). A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, *Rf-1*, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome*, 39 (6): 1205–1209
- Bailey-Serres J, Hanson DK, Fox TD, et al (1986). Mitochondrial genome rearrangement leads to extension and relocation of the cytochrome *c* oxidase subunit I gene in sorghum. *Cell*, 47: 567–576
- Bentolila S, Alfonso AA, Hanson MR (2002). A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (16): 10887–10892
- Budar F, Touzet P, De Paepe R (2003). The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica*, 117 (1): 3–16
- Campbell NJH, Barker SC (1998). An unprecedented major rearrangement in an arthropod mitochondrial genome. *Mol Biol Evol*, 15 (12): 1786–1787
- Chase CD (2007). Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions. *Trends Genet*, 23 (2): 81–90
- Chen L, Liu YG (2014). Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 65: 579–606
- Das S, Sen S, Chakraborty A, et al (2010). An unedited 1.1 kb mitochondrial *orfB* gene transcript in the wild abortive cytoplasmic male sterility (WA-CMS) system of *Oryza sativa* L. subsp. *indica*. *BMC Plant Biol*, 10: 39
- Fujii S, Toriyama K (2009). Suppressed expression of *RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY* restores pollen fertility in cytoplasmic male sterile rice plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (23): 9513–9518
- Fujii S, Toriyama K (2005). Molecular mapping of the fertility restorer gene for *ms-CW*-type cytoplasmic male sterility of rice. *Theor Appl Genet*, 111 (4): 696–701
- Hu J, Huang W, Huang Q, et al (2013). The mechanism of ORFH79 suppression with the artificial restorer fertility gene Mt-GRP162. *New Phytol*, 199 (1): 52–58
- Hu J, Wang K, Huang W, et al (2012). The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *Plant Cell*, 24 (1): 109–122
- Huang W, Hu J, Yu C, et al (2011). Two non-allelic nuclear genes restore fertility in a gametophytic pattern and enhance abiotic stress tolerance in the hybrid rice plant. *Theor Appl Genet*, 124 (5): 799–807
- Huang W, Hu J, Zhu R, et al (2012). Research and development of Honglian-type hybrid rice. *Sci Sin Vitae*, 42 (9): 689–698 (in Chinese) [黄文超, 胡骏, 朱仁山等(2012). 红莲型杂交水稻的研究与发展. *中国科学: 生命科学*, 42 (9): 689–698]
- Huang W, Yu C, Hu J, et al (2015). Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 112 (48): 14984–14989
- Li S, Yang D, Zhu Y (2007). Characterization and use of male sterility in hybrid rice breeding. *J Integr Plant Biol*, 49 (6): 791–804
- Li XM, Zheng YL, Zhang FD, et al (2002). RFLP analysis for mitochondria genome of CMS rice Honglian type. *Hereditas Beijing*, 22 (4): 201–204 (in Chinese with English abstract) [李小明, 郑用琏, 张方东等(2000). 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体DNA的RFLP分析. *遗传*, 22 (4): 201–204]
- Luo D, Xu H, Liu Z, et al (2013). A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nat Genet*, 45 (5): 573–577
- Mackenzie S, McIntosh L (1999). Higher plant mitochondria. *Plant Cell*, 11: 571–586
- Peng HF, Qiu ZG, Chen XH, et al (2006). Pollen fertility and cytological observation of a thermosensitive genic male sterile line of non-pollen type XianS in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Ecol Sin*, 26 (7): 2321–2327 (in Chinese with English abstract) [彭海峰, 邱振国, 陈雄辉等(2006). 无花粉型水稻温敏核不育系粳S的育性表现与细胞学观察. *生态学报*, 26 (7): 2321–2327]
- Peng X, Wang K, Hu C, et al (2010). The mitochondrial gene *orfH79* plays a critical role in impairing both male gametophyte development and root growth in CMS-Honglian rice. *BMC Plant Biol*, 10: 125
- Qin X, Huang Q, Xiao H, et al (2016). The rice DUF1620-containing and WD40-like repeat protein is required for the assembly of the restoration of fertility complex. *New Phytol*, 210 (3): 934–945
- Sasahara T, Katsuo K (1965). Studies on the cytoplasmic difference among rice varieties, *Oryza sativa* L. II. On the abortive pollen of Fujisaka No.5-type plants with the cytoplasm of Chinese wild variety, *Oryza sativa* L. f. *spontanea*. *Jap J Breeding*, 15 (3): 191–196 (in Japanese with English abstract) [笹原健夫, 勝尾清(1965). 稻の細胞質差異に関する研究: II. 野生稻細胞質をもつ栽培稲型植物の不稔花粉について. *育種學雜誌*, 15 (3): 191–196]
- Tester M, Langridge P (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327 (5967): 818–822
- Touzet P, Meyer EH (2014). Cytoplasmic male sterility and mitochondrial metabolism in plants. *Mitochondrion*, 19: 166–171
- Wang Z, Zou Y, Li X, et al (2006). Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell*, 18 (3): 676–687
- Wise RP, Gobelman-Werner K, Pei D, et al (1999). Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize. *J Hered*, 90 (3): 380–385
- Yi P, Wang L, Sun Q, et al (2002). Identification of mitochondria chimeric gene related to Honglian cytoplasmic male sterile rice. *Chin Sci Bull*, 47 (2): 130–133 (in Chinese) [易平, 汪莉, 孙清萍等(2002). 红莲型细胞质雄性不育线粒体相关嵌合基因的发现. *科学通报*, 47 (2): 130–133]
- Zhang G, Bharaj TS, Lu Y, et al (1997). Mapping of the *Rf-3* nuclear fertility-restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. *Theor Appl Genet*, 94 (1): 27–33
- Zhang H, Che J, Ge Y, et al (2017). Ability of *Rf5* and *Rf6* to restore fertility of Chinsurah Boro II-type cytoplasmic male sterile *Oryza sativa* (ssp. *japonica*) lines. *Rice*, 10: 2
- Zhang QY, Liu YG, Zhang GQ, et al (2002). Molecular mapping of the fertility restorer gene *Rf-4* for WA cytoplasmic male sterility in rice. *Acta Genet Sin*, 29 (11): 1001–1004 (in Chinese with English abstract) [张群宇, 刘耀光, 张桂权等(2002). 野败型水稻细胞质雄性不育恢复基因 $Rf-4$ 的分子标记定位. *遗传学报*, 29 (11): 1001–1004]
- Zhu Y (1979). Studies on male sterile lines with different cytoplasmic types in rice. *Acta Agron Sin*, 5 (4): 29–38 (in Chinese) [朱英国(1979). 水稻不同细胞质类型雄性不育系的研究. *作物学报*, 5 (4): 29–38]



## Research progress of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice (*Oryza sativa*)

LIU Shi-Feng<sup>1</sup>, CHEN Qian<sup>1</sup>, HONG Guang-Cheng<sup>1</sup>, HU Jun<sup>2</sup>, QIN Xiao-Jian<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Chongqing Key Laboratory of Molecular Biology of Plants Environmental Adaptations, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Hybrid Rice, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

**Abstract:** Cytoplasmic male sterility (CMS) is a widespread phenomenon in plants. It is mainly characterized by the absence of functional pollen resulting in abnormal fertilization and fruiting. CMS is caused by cytoplasmic genes in plants that exhibit male sterility. Recent studies have shown male sterility caused by CMS genes are genetically bound to mitochondria. Accordingly, genes in the nucleus are present to encode a protein which restores pollen sterility, and these genes are known as fertility restorer genes (*Rf* genes). Furthermore, the production of hybrid rice depends on the discovery and utilization of CMS and it is also an effective way to increase crop production. So far, the mechanism of CMS and fertility restoration were uncovered deeply in rice. This paper mainly introduces the progress of rice CMS genes and the mechanisms of CMS and fertility restoration, which may provide a reference for revealing CMS and fertility restoration mechanism of other crops, and new ideas for the cultivation of hybrid rice.

**Key words:** cytoplasmic male sterility; fertility restoration; nucleus-cytoplasm interaction; molecular mechanism

---

Received 2017-06-26 Accepted 2017-12-01

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0100706), Start-Up Fund from Chongqing Normal University (16XLB018), and the Science and Technology Research Project of Chongqing Education Committee (KJ1600310).

\*Corresponding author (qinxiaojian@cqnu.edu.cn).