

圆果黄麻雌性不育突变体鉴定及其生理生化特性初步研究

陈富成, 祁建民*, 林荔辉, 林培清, 徐建堂, 陈涛, 陶爱芬, 吴建梅, 方平平*

(福建农林大学作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福州 350002)

摘要: 为研究圆果黄麻 (*Corchorus capsularis* L.) 粤圆 6 号不育突变体的类型及不育机理, 以粤圆 6 号及其不育突变体为实验材料, 对其花器官及花粉粒进行了形态观察、碘染实验、体外萌发实验及田间授粉实验, 结果表明, 粤圆 6 号突变体为雌性不育。对两个材料发育不同时期功能叶和花蕾中的可溶性糖和可溶性蛋白含量进行了测定, 结果表明, 可溶性糖和可溶性蛋白在不同时期均表现出动态变化。雌性不育突变体功能叶中的可溶性糖在现蕾前期的含量略低于正常可育材料, 进入现蕾期和结果期, 其可溶性糖却比可育材料分别高出 16.0%、33.3%, 而花蕾组织中的可溶性糖比可育材料降低了 15.5%; 可育材料 3 个时期的功能叶及花蕾组织中可溶性蛋白的表达量分别比不育突变体高出 3.9%、29.2%、79.1%、11.9%。上述代谢表达差异可能与雌性不育有关。

关键词: 黄麻; 雌性不育; 可溶性糖; 可溶性蛋白; 动态变化

中图分类号: Q944.57; Q945.4; Q946

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)02-0194-06

Identification of Jute (*Corchorus capsularis* L.) Female Sterile Mutant and Its Physio-biochemical Characteristics

CHEN Fu-Cheng, QI Jian-Min*, LIN Li-Hui, LIN Pei-Qing, XU Jian-Tang,
CHEN Tao, TAO Ai-Fen, WU Jian-Mei, FANG Ping-Ping*

(Fujian Agriculture and Forestry University of Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics,
Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To study the jute 'Yue Yuan 6' sterile mutant types and its sterile mechanism, morphological observation of pollen grain, iodine-dye assay, sprouting of pollen assay *in vitro* and pollination field experiments were carried out. The 'Yue Yuan 6' sterile mutants were female-sterile type. Soluble sugar and the soluble protein displayed dynamic change differently along with the growth time in functional leaves and flowers between the sterile mutant materials and the fertile materials. The content of soluble sugars in the sterile mutant material were lower than the fertile material in bud previous stage in functional leaves; however, this was opposite in the bud phase and productive phase (16.0% and 33.3%, respectively). Content of soluble sugar was lower in bud tissue of sterile mutant material than the fertile materials (15.5%). Soluble protein expression quantity in functional leaves and bud tissues of the fertile material were higher compared to the sterile mutant material in three different periods (3.9%, 29.2%, 79.1%, 11.9%, respectively). The expression of metabolic difference of the above-mentioned may be related to female sterility.

Key words: Jute; Female-sterile; Soluble sugar; Soluble protein; Dynamic change

雌性不育是植物发生遗传变异的一种普遍现象, 最早报道植物雌性不育是在 20 世纪 50 年代, 现已在油松、兰花、红花、甘蓝型油菜、百合、玉米、

水稻、小麦、苧麻等植物中发现了雌性不育现象^[1]。随着雌性不育现象在越来越多的植物中被发现, 研究也更为重视和深入, 已从生理生化、细胞生物学向

收稿日期: 2010-06-25, 修回日期: 2010-12-27。

基金项目: 国家麻类产业技术体系建设项目 (nycyx-19-E05); 国家农业部公益性产业计划项目 (nyhyzx07018-3); 国家 948 计划项目 (2006-G-18-4)。

作者简介: 陈富成 (1984 -), 男, 硕士研究生, 主要从事黄/红麻种质资源及雌性不育基础研究。祁建民, 教授, 博士生导师。方平平, 副教授, 硕士生导师。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: qijm863@163.com)。

分子生物学和蛋白组学层面深化,以探讨雌性不育发生的机理^[2]。黄麻(*Corchorus capsularis* L.)是优良的韧皮纤维作物,迄今未见有关雌性不育方面的相关研究报道。2008年本课题组在福建农林大学白沙教学农场黄麻粤圆6号群体中发现一株自然不育突变体材料,初步鉴定为雌性不育,并以该不育材料的近等基因可育材料为对照,分析可溶性糖和可溶性蛋白时空表达的动态变化,以期为进一步研究雌性不育发生机理奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以黄麻(*Corchorus capsularis* L.)圆果栽培品种粤圆6号和粤圆6号不育突变体为材料,于2009年4月底将正常可育和不育突变体无性系材料种植在福建农林大学麻类研究室网室中,在现蕾前期,现蕾期、结实期,分别以功能叶(顶部展开往下数第7叶)^[3]、花蕾和花粉粒为供试材料开展系统地研究。

1.2 实验方法

1.2.1 花器官外部形态观察

从现蕾初期到开花期不同阶段,分别对花器官发育形态进行连续观察,取可育正常材料与不育突变体材料同时期相同部位的花蕾,采用目测法、显微观察法、游标卡尺法鉴定其形态的动态发育特征。

1.2.2 碘染实验

花粉粒在滴有1~2滴1%的 I_2 -KI溶液的载玻片上碘染2~3 min,在10×10倍的奥林巴斯电子显微镜下观察拍照并统计可育材料与不育突变体材料碘染率。

1.2.3 花粉粒体外萌发实验

取刚开放的花朵中的花粉粒涂粘在带凹孔的载玻片上,滴加约1 mL经优化的最佳培养基(10%蔗糖+0.002%硼酸)后,放置在28℃、相对湿度为60%^[4]的恒温培养箱中,培养30、60、120 min后分别取供试样品,在10×20倍奥林巴斯电子显微镜下观察5个视野^[5],统计花粉粒萌发率,并拍照。

1.2.4 田间授粉实验

将粤圆6号正常材料、梅峰4号(与粤圆6号亲和力高)与粤圆6号不育突变体进行正反交授粉。取粤圆6号不育突变体的花粉授给已去雄的粤圆6号正常材料和梅峰4号;取粤圆6号正常材料及梅峰4号的花粉授给已去雄的粤圆6号不育突变

体材料。每个正反交组合授粉各50朵。杂交后套袋。在结实期统计结实率。

1.2.5 可溶性糖、可溶性蛋白动态变化测定

参照《植物生理生化实验原理与技术》^[6]及《蛋白质技术手册》^[7]的方法进行测定。在6月10日现蕾前期、8月10日现蕾期、10月10日结实期分别取粤圆6号可育材料及其不育突变体材料相同部位同时期的倒7功能叶,各3份,每份为1 g。在8月10日取两实验材料的花蕾组织,每份各0.5 g。取后的材料均迅速用液氮速冻,放入-80℃超低温冰箱备用。对冻存材料的可溶性糖和可溶性蛋白的含量进行测定。可溶性糖采用蒽酮比色法,可溶性蛋白采用Bradford法。实验重复3次,取平均值。

2 研究结果与分析

2.1 花器官形态观察

对粤圆6号不育突变体材料与粤圆6正常材料进行花器官发育的形态观察,结果表明(图1:A,B), (1)花蕾形态大小不同:不育突变体材料花蕾明显小于可育品种的花蕾,不育突变体材料的花蕾约为 (0.9 ± 0.3) mm,而正常材料花蕾大小约为 (3.4 ± 0.2) mm。(2)花药数不同:不育突变体的花药数一般为8~12个,明显少于正常可育材料的花药数22~25个。(3)花蕾形态不同:不育突变体花蕾现蕾11~13 d开裂,而正常材料花蕾现蕾后25~28 d才开放。(4)粤圆6号不育突变体的柱头生长发育不良而过早退化。花器官形态上的差异,尤其是粤圆6号不育突变体柱头过早退化,是导致不育的主要原因。

2.2 碘染率

花粉粒的碘染率是衡量花粉粒育性的一个重要指标。对供试材料花粉粒用1% I_2 -KI碘染后可看出,黄麻粤圆6号可育材料与不育突变体材料的碘染率基本相同(图2:A,B),均达100%,结果显示两供试材料花粉粒均有活力,由此初步判断,该突变体与雄性不育无关。

2.3 花粉粒体外萌发率

温度条件和培养基组分都是影响植物花粉粒萌发和花粉管生长的重要因素。高温和低温均抑制花粉粒的萌发和花粉管的生长^[8]。培养基中蔗糖浓度可能与花粉管中的膨压大小有关,从而影响花粉管的伸长与萌发^[9]。硼(B)元素在花粉粒萌发中也

起着重要作用,硼元素可以减少花粉的破裂,提高花粉的萌发率,并促使花粉管生长^[10]。粤圆 6 号可育材料与不育突变体材料的花粉粒在体外优化后的培养基组分中,培养 30 min 后开始萌发,并且都在 2 h 后萌发率达到最大值(图 3:A,B),从粤圆 6 号可育材料与不育突变体材料的花粉粒体外萌发情况看,萌发率分别为 80%、78%。结合花粉粒碘染率(图 2:A,B)可知,不育突变体材料的花粉粒有正常活力,与正常可育品种没有差别。

2.4 田间授粉实验结果

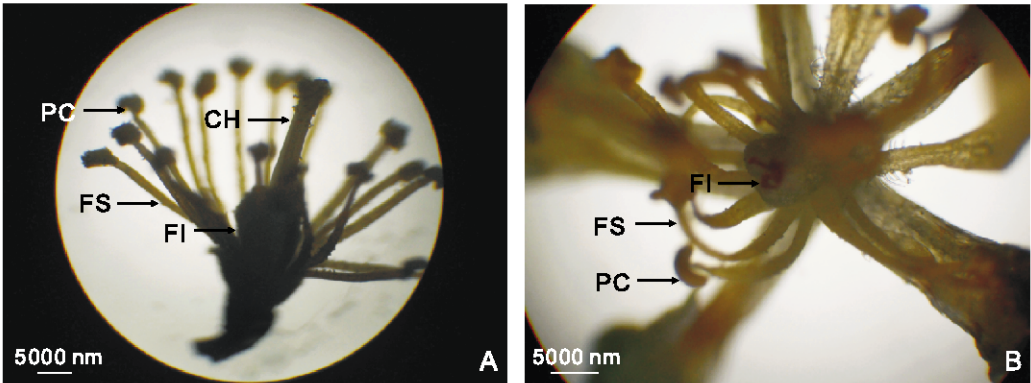
将粤圆 6 号不育突变体分别与粤圆 6 号正常材料及梅峰 4 号做正反交。结果表明:粤圆 6 号不育突变体为父本提供花粉与粤圆 6 号正常材料和梅峰 4 号杂交,都能结实,结实率分别为 82.0%、74.0%;而粤圆 6 号不育突变体作为母本,接受正常可育品种花粉时,都未观察到结实(表 1)。这进一步

验证了粤圆 6 号不育突变体的花粉是有活性的。由上述实验初步鉴定出该突变体材料为雌性不育。

2.5 功能叶和花蕾中可溶性糖及可溶性蛋白表达动态变化

2.5.1 功能叶和花蕾中可溶性糖动态变化

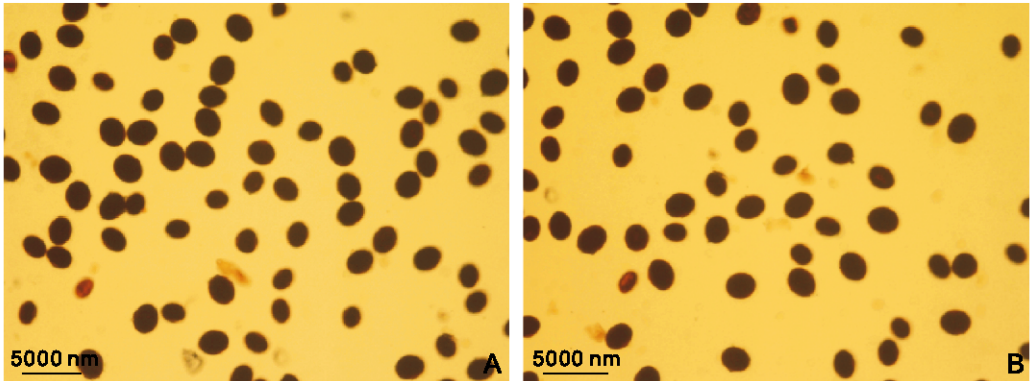
粤圆 6 号与不育突变体在现蕾前期,其功能叶中可溶性糖的含量差异不大,分别为 18.50 mg/g 和 18.01 mg/g (图 4)。随着生长发育,进入现蕾期和结实期后,两材料可溶性糖含量均降低。粤圆 6 号比现蕾前期分别降低了 22.80%、35.90%。而不育突变体与现蕾前期对比,分别仅降低了 8.05%、12.20%。并且在这两个时期不育突变体的功能叶中可溶性糖含量均高于正常可育材料(图 4)。两材料花蕾中的可溶性糖含量也均比功能叶中的含量高,而且在正常可育花蕾中,可溶性糖含量明显高于不育突变体。可溶性糖代谢的这种差异,



A: 粤圆 6 号正常材料; B: 粤圆 6 号不育突变体材料。CH: 花柱; FS: 花丝; FI: 子房; PC: 花药。
A: Yue Yuan 6 fertile material; B: Yue Yuan 6 sterile mutant material. CH: Style; FS: Filament; FI: Ovary; PC: Anther.

图 1 两材料花朵的外部形态结构

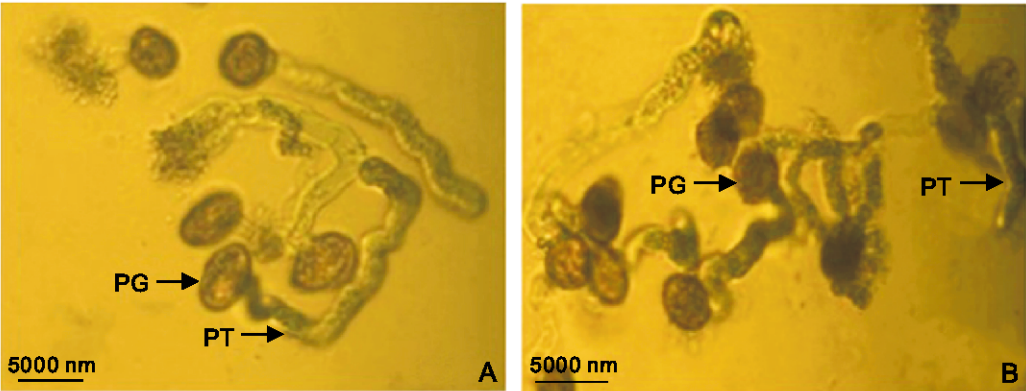
Fig. 1 Flowers' external morphological structure of two materials



A: 粤圆 6 号正常材料; B: 粤圆 6 号不育突变体材料。
A: Yue Yuan 6 fertile material; B: Yue Yuan 6 sterile mutant material.

图 2 花粉粒的碘染率

Fig. 2 Iodine dyeing rate of pollen grain



A: 粤圆6号正常材料; B: 粤圆6号不育突变体材料。PG: 花粉粒; PT: 花粉管。
A: Yue Yuan 6 fertile material; B: Yue Yuan 6 sterile mutant material. PG: Pollen grain; PT: Pollen tube.

图3 两材料花粉粒体外萌发状况

Fig.3 Condition of pollen grain germination *in vitro* of two materials

表1 杂交组合及结实率

Table 1 Hybridized combination and seed-setting rate

杂交组合 Cross combination	授粉花朵数 Num. of flowers pollinated	结实蒴果数 Capsules obtained	结实率(%) Seed setting rate
粤圆6号不育突变体/粤圆6号正常材料 Yue Yuan 6 sterile mutant/ Yue Yuan 6 fertile	50	0	0
粤圆6号正常材料/粤圆6号不育突变体 Yue Yuan 6 fertile/ Yue Yuan 6 sterile mutant	50	41	82.0
粤圆6号不育突变体/ 梅峰4号 Yue Yuan 6 sterile mutant/ Meifeng 4	50	0	0
梅峰4号/粤圆6号不育突变体 Meifeng 4/ Yue Yuan 6 sterile mutant	50	37	74.0

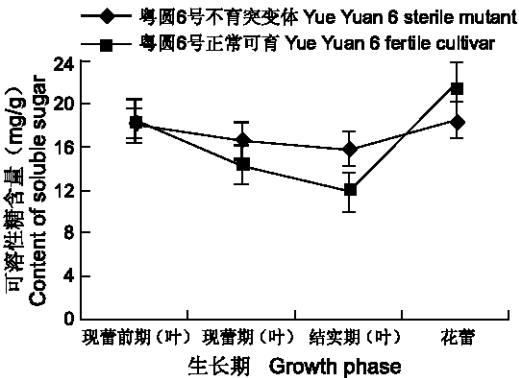


图4 粤圆6号不育株、可育株的功能叶中可溶性糖动态含量和花蕾中可溶性糖含量

Fig.4 Dynamic content of soluble sugar in functional leaves and content of soluble sugar in flower bud in Yue Yuan 6 sterile mutant and fertile material

2.5.2 功能叶和花蕾中可溶性蛋白动态变化

供试材料功能叶和花蕾中可溶性蛋白测定结果见图5,从整体看,无论是在功能叶还是花蕾组织中,正常可育材料可溶性蛋白均高于不育突变体材

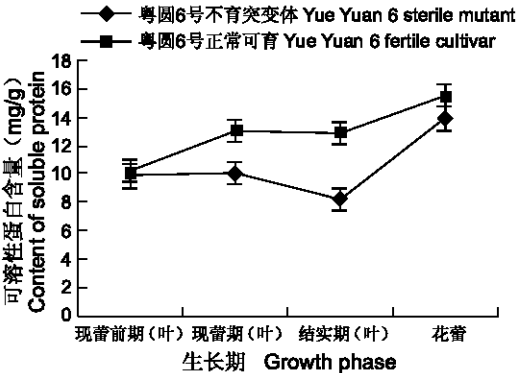


图5 粤圆6号不育株与可育株功能叶中可溶性蛋白动态含量和花蕾中可溶性蛋白含量

Fig.5 Dynamic content in soluble protein in functional leaves and content of soluble protein in flower bud for Yue Yuan 6 sterile mutant and fertile material

可能是引起黄麻粤圆6号突变体雌性不育发生的重要原因之一。

料。各个时期高出的百分比分别为:现蕾前期 3.95%,现蕾期 29.20%,结实期 57.20%,花蕾组织 11.80%。两材料花蕾中的可溶性蛋白都比功能叶中的高,并且功能叶中蛋白变化趋势都呈现出先略有升高后又下降(图5)。不育突变体这种蛋白质代谢异常,可能也是导致植物雌性不育的重要原因之一。

3 讨论

3.1 黄麻雌性不育的类型

典型的植物雌性不育表现的形态特征是:无花柱和柱头,仅有瘦瘪的子房组成雌蕊,花柱呈极细丝状,向下弯曲与子房粘连^[2];雌蕊虽外表正常(具有正常的柱头,花柱和子房),但子房内部发育异常^[11]。在雌性不育发生同时,有时会伴有雄性不育^[1]。根据败育发生的部位和所处的发育过程,植物雌性不育主要有以下3种类型^[12]:(1)雌性器官根本不分化或雌性器官的心皮完全为雄蕊而雄性化;(2)胚囊异常导致不育;(3)子房的其它结构异常导致不育(如花器官等发育异常)。粤圆6号不育突变体,其雄蕊发育正常,花粉粒能萌发,有正常活力,是属于因其柱头发育不良过早退化引起的雌性不育类型。

3.2 黄麻雌性不育的生理生化与蛋白质代谢表达

植物雌性不育是育性基因在一定时空表达以及内外因子对这种表达综合影响的结果^[13]。可溶性糖是植物体内重要的碳源物质,其积累量影响植物的生长发育^[14]。研究发现,植物体可溶性糖还参与植物开花控制基因表达的调控^[15]。其含量对花器官的正常发育起到至关重要的作用^[16]。在本实验功能叶中可溶性糖呈现出这种变化趋势的原因,笔者认为可能是由于粤圆6号雌性不育材料进入现蕾期时,叶片中积累的可溶性糖向花蕾输送途径受阻引起的,亦可能是其花蕾自身糖合成代谢发生了异常,从而使雌性不育株和正常可育植株的糖代谢发生差异。

一般认为植物在生长过程中需要旺盛的蛋白质代谢,否则花器官生长发育将发生异常^[17]。本研究中粤圆6号雌性不育株的功能叶和花蕾组织中的蛋白质都比其正常植株表达量低,其可能的原因是:雌性不育株的氮代谢异常,蛋白质合成能力下降。在棉花^[18]、玉米^[19]、水稻^[20,21]中都发现了不育花药

组织蛋白质的含量低于可育植株。

粤圆6号雌性不育和可育材料形态及生理生化表征为解释其雌性不育提供了科学依据,印度学者认为雌性不育与可育材料生理特征差别,是雌性不育的原因还是结果,尚存争议^[22]。为了更好地揭示黄麻雌性不育的机理,应加强对该材料的研究:(1)进一步加强对该材料雌性不育的遗传学、细胞学、生理学的研究,以揭示遗传规律及生理生化与环境因素的关系。(2)加强对该材料分子生物学研究,如对雌性器官特异表达基因、雌性不育基因及蛋白质组学等方面的研究,找到雌性不育有关的差异表达蛋白。

黄麻雌性不育的研究目前尚属空白,本实验仅是初步研究,虽然证实了黄麻雌性不育系与正常可育系在可溶性糖和可溶性蛋白等物质代谢动态变化的差异,但仍然处于初步探索阶段,而且由于雌性不育突变材料的花蕾较正常的花蕾小得多,不易区分花蕾发育的时期,以至本实验只研究了功能叶中各时期可溶性糖、可溶性蛋白代谢的时空表达的动态变化,我们未对花蕾各时期可溶性糖和可溶性蛋白动态变化进行研究,仅测定了花蕾整体代谢物质可溶性糖和可溶性蛋白的含量。而功能叶的生理生化与生殖器官发育的生理生化及蛋白分析结果可能存在差异,因此今后在取样组织部位方面还需做进一步研究。

参考文献:

- [1] 钟蓉,肖郁明,高方远.植物雌性不育的研究进展[J].大自然探索,1998,63(1):73-78.
- [2] 胡青,高述民,李凤兰.植物雌性不育的研究进展[J].北京林业大学学报,2004,26(1):87-91.
- [3] 刘飞虎,梁雪妮.苧麻雄性不育性生理生化特点初步研究[J].中国麻作,2000,22(3):16-20.
- [4] 余政军,刘志,余筱南,刘少卿,王国槐.棉花花粉体外萌发活力与结铃性关系初探[J].湖南农业科学,2009,(12):27-29.
- [5] 李国平,黄群策,杨鹭生,秦广雍.黑松花粉体外萌发与花粉管生长的研究[J].林业科学研 2007,20(2):224-229.
- [6] 李合生主编.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [7] 汪家政,范明主编.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2008,42-46.
- [8] Delph L F, Johannsson M H, Stephenson A G. How

- environmental factors affect pollen performance: Ecological and evolutionary perspectives [J]. *Ecology*, 1997, 78(6): 1632–1639.
- [9] Pierson E S, Li Y Q, Zhang H Q. Pulsatory growth of pollen tubes investigation of a possible relationship with the periodic distribution of cell wall components[J]. *Acta Bot Neerl*, 2005, 44 (2): 121–128.
- [10] 王源. 花粉粒的萌发和花粉管通道法简述[J]. 中学生物学, 2010, 26(1): 5–6.
- [11] 高荣村, 姜程曦, 魏晓星, 陆金根, 李金军. 水稻雌性不育突变体研究进展及应用展望[J]. 浙江农业科学, 2009, 5: 853–855.
- [12] 包仁艳. 油松雌性不育系胚珠败育机制的初步研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [13] 袁德义, 谭晓风, 张琳, 何小勇, 赵思东, 乌云塔娜, 段经华, 李秀根. 新高系梨雌性不育的鉴定[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 289–294.
- [14] Araki T, Komeda Y. Flowering in darkness in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2006, 4 (5): 801–811.
- [15] Koch K E. Carbohydrate modulated gene expression in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1996, 47: 509–540.
- [16] 董章慧, 张立军, 崔震海. 糖对植物成花调节[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 11965–11966, 11969.
- [17] 滕海涛, 鲁守平, 赵邦青, 孔少华, 李勇. 植物花药培养预处理及生理生化变化规律[J]. 河北农业科学, 2008, 12(10): 46–49, 59.
- [18] 张天真, 靖深蓉. 棉花雄性不育杂交种选育的理论实践[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 21–32.
- [19] 夏涛, 刘纪麟. 玉米细胞雄性不育系物质代谢系统的研究[J]. 华中农业大学学报, 1993, 12(1): 1–6.
- [20] 俞美玉, 王熹, 陶龙兴. CRMS 诱导水稻雄性不育研究Ⅲ. CRMS 对水稻花药游离脯氨酸含量的影响及其与花药败育的关系[J]. 中国水稻科学, 1991, 5(4): 169–174.
- [21] 秦泰辰. 作物雄性不育化育种[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 70–83.
- [22] Raj K G, Siddiq E A. Biochemical characterization for normal and male sterile anthers in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Indian J Genet Plant Breed*, 2008, 46(3): 541–549.

(责任编辑: 张平)