

甜瓜雄性不育植株雄蕊发育结构及生理生化特征

盛云燕^{1,*}, 常薇^{1,2}, 矫士琦³, 戴冬洋¹

¹黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江大庆163319; ²黑龙江省建三江创业农场, 黑龙江佳木斯156321; ³东北农业大学园艺学院, 哈尔滨150030

摘要: 为了探索甜瓜细胞核雄性不育系ms5花药败育发生的时期及不同时期雄花物质含量与雄性不育之间的关系, 采用甜瓜雄性不育两用系不育株ms5及可育株mf5雄花为研究材料, 分别开展花药发育结构的电镜观察, 并且对各时期雄花生理生化特性进行物质含量的测定。电镜观察显示ms5花粉育性为0, mf5花粉活力高达98%以上; 不育株与可育株花药在四分体时期出现明显差异, 可育株花粉囊开裂, 花粉粒溢出, 而不育株花粉囊干瘪, 无开裂迹象。不育株各个时期丙二醛含量均高于可育株(开花前期除外), 不育株可溶性糖含量都低于同时期的可育株, 不育株蛋白质含量及游离脯氨酸含量均在花药发育四分体时期出现转折变化, 说明不育株花器官存在物质能量代谢降低现象, 物质元素的积累与甜瓜败育相关。

关键词: 甜瓜; 雄性不育; 扫描电镜; 生理生化

甜瓜(*Cucumis melo*)营养丰富, 种植面积广泛, 是东北地区棚室生产的重要经济作物之一。甜瓜具有较强的杂种优势, 目前甜瓜性别研究已经成为育种工作研究的重点(Luan等2010), 以往的研究多集中在甜瓜的单性花上, 雄性不育未见相关研究。研究甜瓜雄性不育具有重要的应用价值。利用雄性不育制种, 亲本繁殖比较容易, 省去了人工去雄, 节省了人力和物力, 降低了种子生产成本, 提高了种子质量, 更可以获得高纯度的一代杂种。雄性不育涉及到对不育系形态学、细胞学、遗传学、生理生化以及分子生物学等多方面研究。植物可遗传性的雄性不育分为细胞质雄性不育及细胞核雄性不育(杜士云等2012), 细胞核雄性不育是由核基因控制的雄性不育, 有显性核不育和隐性核不育之分; 而细胞质雄性不育则是由细胞质基因控制的, 表现为母体遗传(Liu和Chen 2014)。近年来, 关于雄性不育基因在多种作物上开展了基因定位及功能分析(杨莉芳和刁现民 2014)。水稻雄性不育研究较其他作物深入, 目前已克隆了超过20个水稻隐性核雄性不育基因。根据不育基因的功能和表达时期的差异, 可将水稻隐性核雄性不育基因大致分为调控小孢子母细胞发育、减数分裂、绒毡层发育、小孢子和花粉外壁发育以及花药开裂等相关的不育基因(张文辉等 2015; 王道杰等2014; Liu和Chen 2014)。不同作物之间雄性不育发生时间, 产生机理也不尽相同。近年来, 许多学者对大白菜、甘蓝、辣椒、苜蓿、芹菜、胡萝卜、萝卜等多种作物开展了雄性不育生理生化特征的研究, 发现在基础性代谢方

面不育系与保持系存在较大的差异(窦振东等 2013; 王晓林等2013; 高国训等2013)。对胞质甘蓝雄性不育系花药发育进行细胞学观察发现小孢子败育时期发生在四分体时期至单核花粉期, 绒毡层液化导致败育的基本原因(高营营2014)。用DT2-3电镜扫描观察西瓜雄性不育两用系发现不育株雄蕊萎缩畸形, 横切剖面无花粉粒, 揭示了它的不育株败育的机制(马建祥等2011)。对水稻、番茄、甘蓝、萝卜、棉花的研究表明, 不育系花药内完全没有脯氨酸或脯氨酸的含量明显低于可育株, 并发现脯氨酸的含量与花粉育性之间呈正相关。物质代谢与雄性不育关系研究中, 游离脯氨酸含量研究的较多, 其含量对花粉发育具有非常重要的作用。

甜瓜雄性不育突变体ms5最早由美国Clause种子公司在抗白粉病品种‘PMR45’育种过程中发现, 并应用于杂交一代制种中(Garcia-Mas等2012; Park和Crosby 2004)。该突变体植株雄花的花蕾发育初期就明显少于可育株, 在雄花或者完全花植株中, 花药数目减少空瘪, 在田间容易通过表型鉴定。本研究前期对甜瓜雄性不育系ms5遗传规律的研究发现, 雄性不育突变体ms5与可育自交系HM配置杂交组合, F₁群体为可育, F₂群体不育株与可育株的分离比率为1:3, 回交群体BC₁P₁不育株与可育株分离比率为1:1, BC₁P₂群体均为可育植株。

收稿 2016-03-29 修定 2016-06-06
资助 国家自然科学基金(31401892)、教育部留学回国人员科研启动基金和黑龙江八一农垦大学大学生创新实验项目。

* 通讯作者(E-mail: shengyunyan12345@163.com)。

因此判断甜瓜雄性不育ms5性状为一对隐性基因控制的细胞核雄性不育。甜瓜雄性不育的研究一直滞后于其他作物, 相关生理特征的研究未见报导。本研究主要以甜瓜雄性不育两用系不育株ms5和可育株mf5为试材, 进行花粉活力、雄蕊结构调查比较, 明确二者花粉育性的差异; 从细胞学角度, 利用显微电镜对甜瓜雄性不育两用系的可育株和不育株花药进行显微结构对比研究, 同时对花器官生理生化特性进行对比分析, 为探索甜瓜ms5植株不育的发生机理以及生化遗传机制提供依据。

材料与方法

1 试验材料

选取甜瓜(*Cucumis melo*)雄性不育两用系不育株(ms5)及可育株(mf5), 于2015年3月播种育苗, 定植于黑龙江八一农垦大学园艺实验大棚。利用S-3400N型扫描电子显微镜(Hitachi, 日本)观察甜瓜雄蕊的发育情况, 包括甜瓜不育与可育株雄花花粉活力的鉴定、雄蕊发育的电镜扫描观察及花粉溢出情况。将花蕾分为4个时期进行花药的结构观察: 第1时期, 花蕾单核花粉期(花蕾<1.5 mm); 第2时期, 花粉发育期(小花2.0~2.5 mm); 第3时期, 花粉成熟期(小花≈4.0 mm)及第4时期, 开花2 d前(王强等2009)。生理生化指标测定选取生长期的植株茎、生长点下第一片叶片及以上花蕾4个不同发育时期进行测定。

2 试验方法

花粉活力鉴定采用醋酸洋红染色法; 雄蕊整

体情况采用扫描电镜观测。生理指标测定方法为: 游离脯氨酸含量测定采用酸性茚三酮比色法; 可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮兰法; 硫代巴比妥酸显色法测定丙二醛含量; 蒽酮法测定可溶性糖含量。各指标进行3次重复, 取平均值, 所得数据用Microsoft Excel软件处理。

实验结果

1 花粉活力鉴定

利用醋酸洋红对甜瓜雄性不育株(ms5)与可育株(mf5)花粉进行染色鉴定。分别随机选择5个视野在电镜下观察, 可育株mf5花粉活力高达98%以上, 人工授粉率为95%以上; ms5植株花粉育性均为0, 人工授粉成功率为0 (图1), 花粉染色率为0。ms5和mf5花粉的染色率呈显著差异, 说明不育株ms5无育性。

2 雄蕊发育观察

扫描电镜观察ms5和mf5雄蕊结构发现: 不育株与可育株在花蕾外表上无明显差别, 花蕾大小相同, 差异不显著, 花期相近, 均在定植后30 d左右开放雄花。电镜观察雄蕊整体结构不育株ms5的雄蕊表面颜色亮黄色、光滑, 无任何花粉, 花药干瘪, 不开裂, 开花后无花粉散出; 可育株mf5雄蕊饱满、圆润, 雄蕊表面布满花粉。随着花蕾的不断增大, 花药体积随之膨大, 由早期的浅黄, 逐渐变为黄色, 再到金黄色; 成熟后, 有金黄的花粉散出(图2)。

将雄性不育株ms5雄蕊进行扫描电镜观察(图3), 发现花粉在四分体时期不育株和可育株的花药

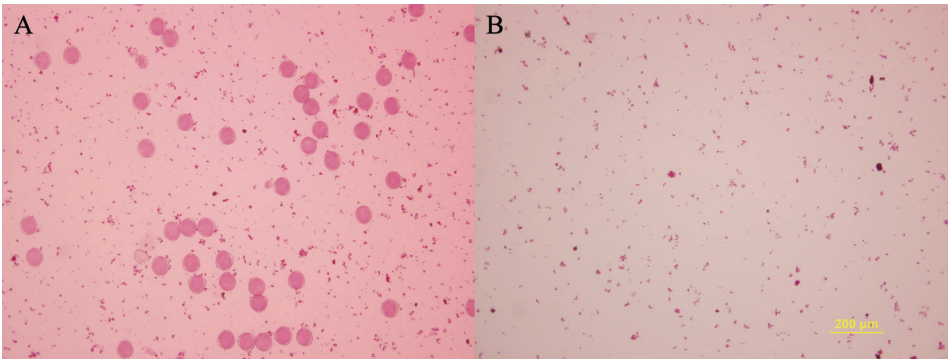


图1 甜瓜雄性可育株与不育株花粉活力鉴定
Fig.1 Identification of pollen viability of male fertility and sterility melons
A: 可育株mf5; B: 不育株ms5。

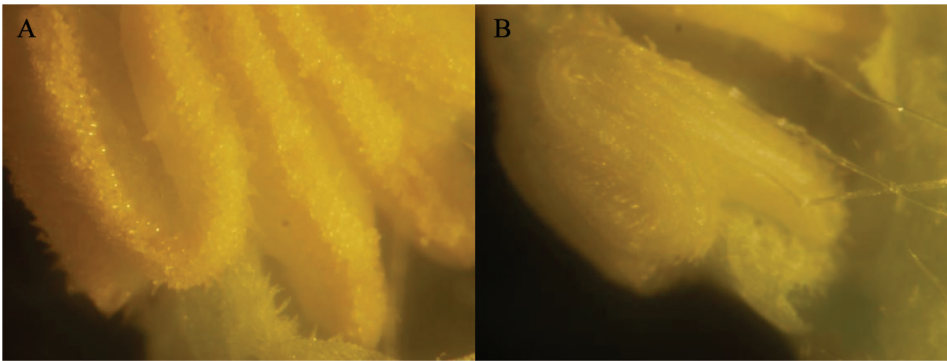


图2 甜瓜雄性可育株与不育株雄蕊结构观察
Fig.2 Observation on stamen structure of male fertility and sterility melons
A: 可育株mf5; B: 不育株ms5。

无明显差异,而进入到单核花粉期,可育株花药与不育株差别明显,可育株花药呈N型且饱满,不育株花药干瘪,花粉囊较空,说明甜瓜ms5雄性不育材料花粉败育可能发生在四分体至单核花粉期,而这个时期正是植株发生败育的高峰期(图3-A和B)。可育株花粉在花粉成熟期可见花粉囊部分开裂,且有花粉粒溢出,而不育花粉囊干瘪,无开裂迹象(图3-E和F);植株开花前2 d对花粉进行观察发现可育株花粉囊全部开裂,花粉粒全部溢出,不育株花粉囊干瘪,无花粉粒,无开裂迹象(图3-G和H)。综上可知,不育材料雄蕊在发育过程中,花药呈N型,花粉囊干瘪且不开裂,不能在花期成熟期溢出花粉,可能是导致败育的原因。

3 生理生化指标测定

3.1 丙二醛含量

不育株(ms5)营养生长期的茎与可育株(mf5)营养生长期茎中丙二醛含量(图4)相似,无显著差异,第1片叶片中mf5中丙二醛含量明显低于ms5植株;而在花粉发育不同时期花蕾中丙二醛含量在mf5中呈逐渐上升的趋势,在ms5中整体呈上升趋势,但是在第3个时期即花粉成熟期丙二醛含量出现下降的趋势,而后又出现回升。比较mf5和ms5不同时期丙二醛含量发现,不育系植株ms5在各个时期丙二醛含量均高于可育株mf5丙二醛含量,但是开花前期除外。

3.2 可溶性糖的含量

图5可知,在叶片中可溶性糖含量均为不育株ms5高于可育株mf5,但是在花蕾中的检测则正好相反。在花蕾不同发育时期mf5和ms5整体看变化

趋势一致,都是上升然后下降的趋势,但无论在哪个发育时期,不育系的可溶性糖含量都低于同时期可育株可溶性糖含量,尤其是花蕾发育到第2时期左右时,二者的差距逐渐增大,之后保持差异不显著的水平。

3.3 蛋白质含量

由图6可知,不育株ms5与可育株mf5的茎、叶、花蕾发育第1时期蛋白质含量差异不显著,从花蕾发育的第2时期开始,蛋白含量出现差异,随着花蕾不断发育,不育株的蛋白质含量呈下降趋势而后增加,而可育株蛋白质含量则是逐渐减少,蛋白含量的转折点出现在花蕾发育的第2时期及花粉发育期。

3.4 游离脯氨酸含量

不育株ms5和可育株mf5花蕾不同发育时期游离脯氨酸含量变化如图7可知,在植株茎和叶中不育株的游离脯氨酸含量高于可育株,在花蕾发育过程中情况无明显趋势:在花蕾发育第1时期和第4时期,游离脯氨酸的含量在可育株中低于不育株,但是在花蕾发育第2、3时期可育株的脯氨酸含量则高于不育株,说明在花药发育四分体时期及花药发育期,游离脯氨酸含量出现变化。

讨 论

植物雄性不育是不育基因直接或间接表达的结果,雄配子体发育经历了单核期和双核期,最后形成了成熟的花粉粒(张永兵等2011)。根据王强等(2009)对甜瓜性别分化的显微结构观察研究,将甜瓜雄花发育分成11个步骤:雄花原基-雄花原基

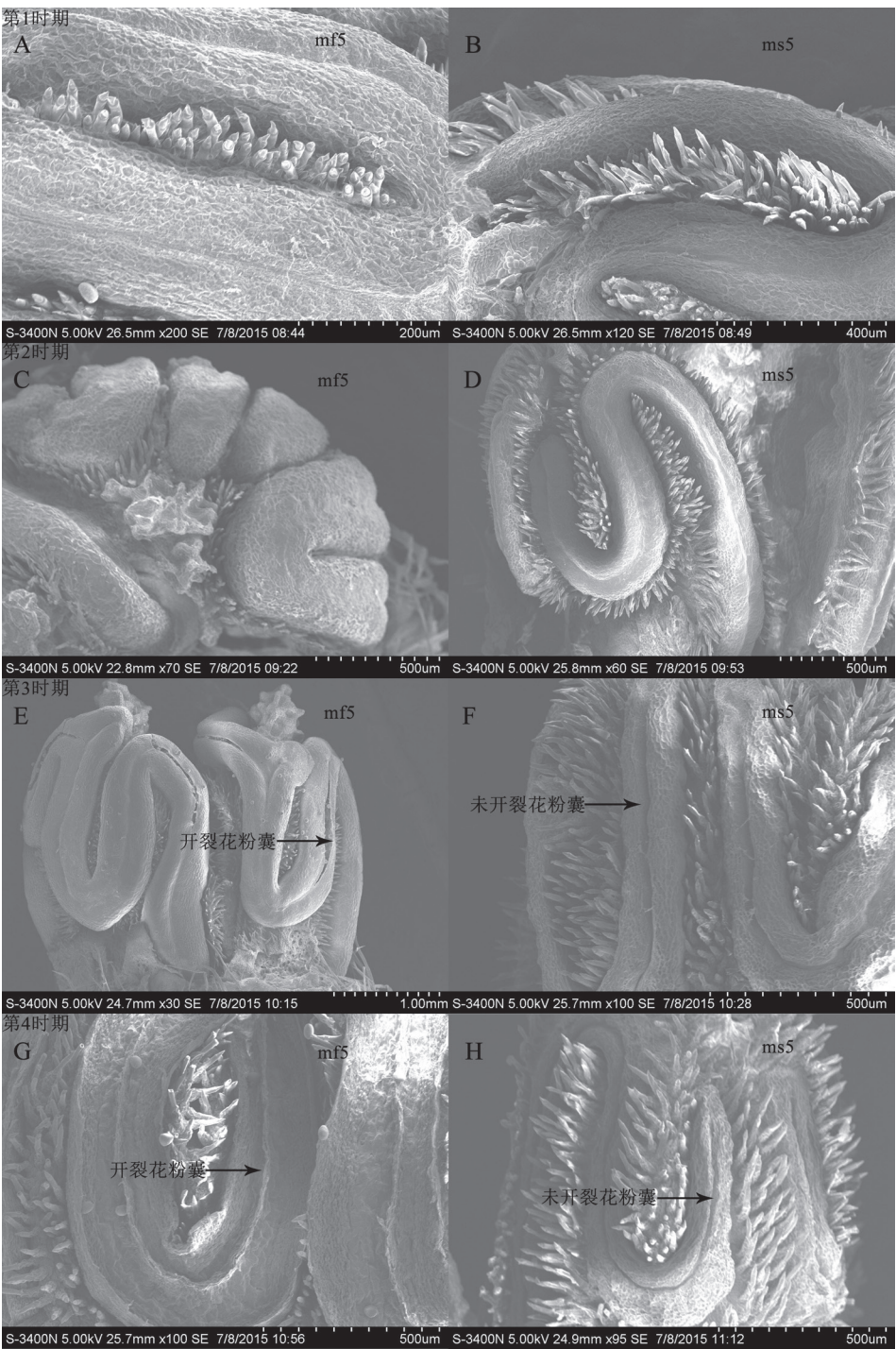


图3 甜瓜雄性可育株与不育株雄蕊花粉局部结构

Fig.3 Part structure of pollen in stament of male fertility and sterility melons

A: 第1时期可育株雄蕊; B: 第1时期不育株雄蕊; C: 第2时期可育株雄蕊; D: 第2时期不育株雄蕊; E: 第3时期可育株雄蕊; F: 第3时期不育株雄蕊结构; G: 第4时期可育株雄蕊; H: 第4时期不育株雄蕊。

膨大-5枚雄蕊分化-花丝形成-花药原始体形成-花粉母细胞-二分体-四分体-单核花粉期-花粉发育期-成熟花粉期, 其中单核花粉粒以前的时期都发

生在雄花直径小于2 mm的阶段。本研究根据以上研究结果将取样时间定为雄花不同直径大小, 代表花药发育的不同时期。通过电镜扫描观察, 甜

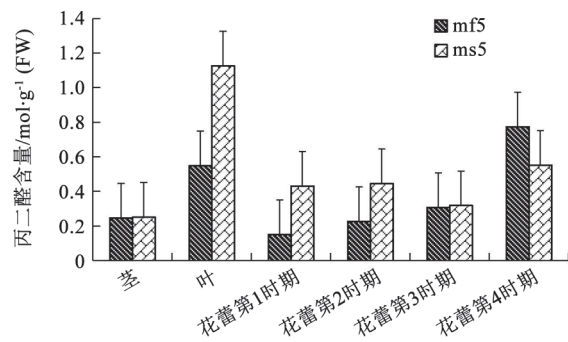


图4 甜瓜雄性可育株与不育株不同时期不同部位丙二醛含量
Fig.4 The comparison of MDA contents in different parts and periods of male fertility/sterility melons
fs5: 雄性可育株; ms5: 雄性不育株; 下同。

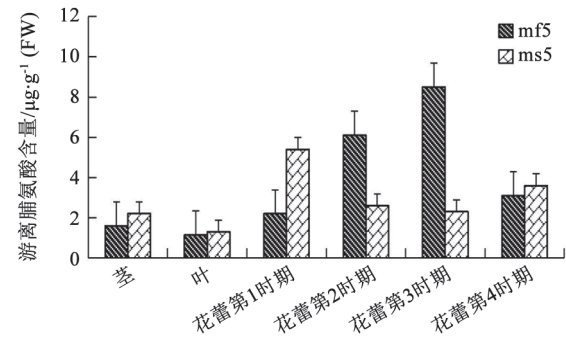


图7 甜瓜雄性可育株与不育株不同时期不同部位
游离脯氨酸含量

Fig.7 The comparison of free proline contents of different parts and periods of male fertility/sterility melons

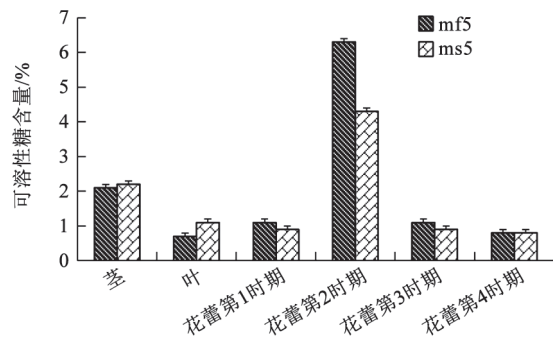


图5 甜瓜雄性可育株与不育株不同时期不同部位含糖量
Fig.5 The comparison of sugar contents of different parts and periods of male fertility/sterility melons

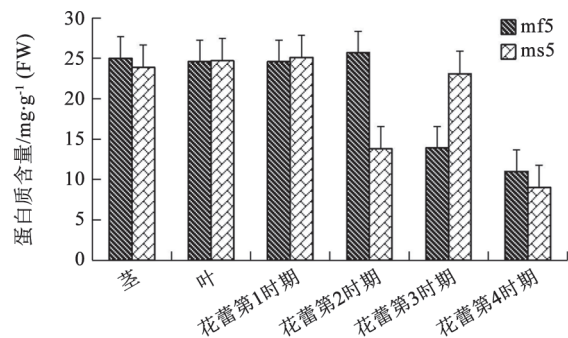


图6 甜瓜雄性可育株与不育株不同时期不同部位蛋白质含量
Fig.6 The comparison of protein contents in different parts and periods of male fertility/sterility melons

瓜雄性不育株ms5在整个雄花发育过程中均没有花粉囊的形成,通过比较可育株mf5发现花粉囊形成及开裂主要差异发生在花药发育四分体时期,这与大多数小孢子败育类型的雄性不育植株相似,

大量的实验研究也证实败育的高峰期也发生在四分体至小孢子单核期(张永兵等2011)。本研究只在宏观水平观察ms5雄性不育系是由于花粉囊不开裂造成的败育,败育发生在小孢子发育的哪一个时期还需要进一步的观察。根据花药败育时期和方式将雄性不育分为无药室型不育系、花粉母细胞败育型及单核败育型,结合初步观察,推断甜瓜雄性不育花芽发育在四分体至单核期,因此可能是属于雄性不育的单核败育型,是由于花药发育受阻导致败育。

植物正常发育的小孢子在发育过程中需要积累大量的蛋白质、氨基酸、淀粉和糖类物质等营养物质,它们是植物进行正常生长发育和代谢必不可少的重要元素,这些物质的亏损可能对雄性不育的发生起到诱导作用。大量研究发现雄性不育系及其保持系的含糖量及蛋白质含量存在显著差异,多数保持系的含量高于不育系(窦振东等2013)。本研究中不育株中的糖含量都低于同时期的可育株,认为不育系中糖代谢紊乱,可能与花药败育相关。蛋白质含量变化与以往研究者在其他作物上的研究未出现相同变化趋势,而是在单核花粉期出现波动,尤其是在不育株中表现明显,由此推断蛋白代谢的变化对花粉不育也造成一定的影响。研究还对丙二醛和游离脯氨酸的含量进行了测定,可育株各个时期的丙二醛含量均高于不育株,但是开花前期除外,说明开花前期的丙二醛的积累达到一定程度,对植株花药发育造成影响之后,开花前丙二醛含量开始在可育株中下降。

窦振东等(2013)研究发现不同大白刺不育材料在减数分裂期便开始积累MDA, 而可育材料的MDA含量则在小孢子发育期开始稍有增加, 丙二醛作为自由基作用于脂质发生过氧化反应的产物, 其含量的高低在一定程度上反映了膜脂遭破坏的程度, 说明不育花蕾中脂膜的破坏程度比可育花蕾高, 也可能是造成花粉败育的可能性之一。脯氨酸可以与碳水化合物相互配合提供营养, 促进花粉发育和伸长。本研究比较保持系与不育系游离脯氨酸含量发现, 进入花药发育的四分体时期后, 可育系中的脯氨酸含量明显高于不育系, 与前人研究认为花药败育是其内脯氨酸合成能力减弱造成的推断相同。从营养学角度考虑造成甜瓜雄性不育的原因可能是营养体向花药运输发生障碍或者花药中脯氨酸合成能力减弱。在本研究中, 未出现在某一指标中不同时期物质含量在可育株中均高于不育株的现象, 这与其他作物出现明显一致趋势的情况不同, 还需要进一步进行验证研究。

参考文献

- Dou ZD, Yan L, Zhao SW, Zhang XH, Liu Z (2013). Physiological and biochemical properties and ultrastructure of male sterile *Nitraria roborowskii* Kom. J Arid Land Resour Environ, 27 (12): 137–141 (in Chinese with English abstract) [窦振东, 燕玲, 赵淑文, 张先红, 刘哲荣(2013). 大白刺雄性不育株超微结构和生理生化特性研究. 干旱区资源与环境, 27 (12): 137–141]
- Du SY, Wang DZ, Wu S, Wang H, Wang SH (2012). Changes of anti-oxidant enzyme activities in anthers and leaves from three types of rice male sterile lines. Plant Physiol J, 48 (12): 1179–1186 (in Chinese with English abstract) [杜士云, 王德正, 吴爽, 王辉, 王守海(2012). 三类雄性不育水稻花药和叶片中抗氧化酶活性变化. 植物生理学报, 48 (12): 1179–1186]
- Gao GX, Wang WT, Wu F, Liu HJ, Zhu X, Peng LX (2013). Analysis on physiological and biochemical characteristics of cytoplasmic male sterile line and its maintainer line in celery. Tianjin Agri Sci, 19 (8): 1–4 (in Chinese with English abstract) [高国训, 王武台, 吴锋, 刘惠静, 朱鑫, 靳力争, 彭立新(2013). 芹菜胞质雄性不育系与保持系生理生化特性分析. 天津农业科学, 19 (8): 1–4]
- Gao YY (2014). Analysis on cytological physiological and biochemical of cytoplasmic male-sterility in cabbage (*Brassica oleracea* L.) (Master's thesis). Harbin: Northeast Agricultural University [高莹莹(2014). 结球甘蓝细胞质雄性不育系细胞学及生理生化分析(硕士论文). 哈尔滨: 东北农业大学]
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L, Lowy E, et al (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). Proc Natl Acad Sci USA, 109 (29): 11872–11877
- Liu YG, Chen LT (2014). Male sterility and fertility restoration in crops. Annu Rev Plant Biol, 65: 579–606
- Luan FS, Sheng YY, Wang YH, Staub JE (2010). Performance of melon hybrids derived from parents of diverse geographic origin. Euphytica, 173 (1): 1–16
- Ma JX, Zhang X, Zhang Y, Yang RP, Wang S (2011). Scanning electron microscopic observation to the male sterile line of stamen in watermelon. Northern Hort, (3): 151–152 (in Chinese with English abstract) [马建祥, 张显, 张勇, 杨瑞平, 王松(2011). 西瓜雄性不育两用系雄蕊电镜扫描观察. 北方园艺, (3): 151–152]
- Park SO, Crosby KM (2004). Identification and confirmation of RAPD and SCAR markers linked to the *ms-3* gene controlling male sterility in melon (*Cucumis melo* L.). J Amer Soc Hort Sci, 129: 819–825
- Wang DJ, Yang CL, Liu Z, Dong L (2014). Cytological characterization and gene expression of carpelloid stamen of apetalous flower in *Brassica napus* L. Plant Physiol J, 50 (3): 290–296 (in Chinese with English abstract) [王道杰, 杨翠玲, 刘展, 董龙(2014). 无花瓣油菜雄蕊心皮化突变体细胞学观察及基因表达分析. 植物生理学报, 50 (3): 290–296]
- Wang Q, Zhang JN, Li JH (2009). Histological observation of sex differentiation on melon. J Gansu Agric Univ, 44 (6): 79–84 (in Chinese with English abstract) [王强, 张建农, 李计红(2009). 甜瓜性别分化的显微结构观察. 甘肃农业大学学报, 44 (6): 79–84]
- Wang XL, Wang LL, Chen LZ, Zhang R, Wei BQ (2013). A comparison of biochemical characters between male sterile line and maintainer lines of pepper. J Gansu Agric Univ, 48 (4): 64–67 (in Chinese with English abstract) [王晓林, 王兰兰, 陈灵芝, 张茹, 魏兵强(2013). 辣椒胞质雄性不育系与保持系的生理生化特性. 甘肃农业大学学报, 48 (4): 64–67]
- Yang LF, Diao XM (2014). Progress in identification of plant male sterility related nuclear genes. J Plant Genet Res, 14 (6): 1108–1117 (in Chinese with English abstract) [杨莉芳, 刁现民(2014). 植物细胞核雄性不育基因研究进展. 植物遗传资源学报, 14 (6): 1108–1117]
- Zhang WH, Yan W, Chen ZF, Xie G, Lu JW, Liu DF (2015). Genetic analysis and mapping of the rice male sterile mutant *oss125*. China Agri Sci, 48 (4): 621–629 (in Chinese with English abstract) [张文辉, 严维, 陈竹锋, 谢刚, 卢嘉威, 刘东风, 唐晓艳(2015). 水稻雄性不育突变体*oss125*的遗传分析及基因定位. 中国农业科学, 48 (4): 621–629]
- Zhang YB, Chen JF, Yi HP, Qian CT, Wu MZ (2011). Cytological studies on meiosis of pollen mother cells and development of male gametophyte in melon. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 31 (3): 446–450 (in Chinese with English abstract) [张永兵, 陈劲枫, 伊鸿平, 钱春桃, 吴明珠(2011). 甜瓜花粉母细胞减数分裂及雄配子体的细胞学研究. 西北植物学报, 31 (3): 446–450]

Stamen structure development and physiological and biochemical characteristics in male sterile melon

SHENG Yun-Yan^{1,*}, CHANG Wei^{1,2}, JIAO Shi-Qi³, DAI Dong-Yang¹

¹Agriculture College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China; ²Chuangye Farm of Heilongjiang Construct Three Rivers Grand, Jiamusi, Heilongjiang 156321, China; ³Horticulture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: In order to detect the period of abortion of the male sterile melon (ms5) and relationship between metabolism and male sterility line, flower buds from male sterile plant ms5 and male fertile plant mf5 were used to observe the structure of male flower by scanning electron microscope, respectively. Physiological and biochemical characteristics of anther were also investigated. Results indicated that pollen ability of ms5 was 0, and pollen ability of male fertile plants was almost 98% by electrical scanning microscope. Significant different were detected in tetrads periods in pollen development, most pollen sac were broken in this period in male fertile plant whereas different in male sterile plant, pollen sac were empty in male sterile plants and pollen grain were not export, all these may reduce male sterility in melon ms5. Contents of malondialdehyde of all test periods of male fertile plant were higher than male sterile plant except for before flowering periods. Sugar contents of male sterile was higher than male fertile plants, and contents of free proline and protein has significant changes at tetrads periods of male fertile plants, which indicating metabolic levels reduce in male sterile plants on melon and the materials accumulation may has relationship with male sterile.

Key words: melon; male sterility; electrical scanning microscope; physiological and biochemical characteristics

Received 2016-03-29 Accepted 2016-06-06

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31401892), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, and University Innovation Research and Training Program of Heilongjiang Bayi Agricultural University.

*Corresponding author (E-mail: shengyunyan12345@163.com).