DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04069

专题

利用红麻 *HcPDIL5-2a* 非全长基因创制雄性不育新种质

周步进^{1,2} 李刚³ 金刚⁴ 周瑞阳^{1,*} 刘冬梅⁵ 汤丹峰³ 廖小芳⁴
刘一丁¹ 赵艳红⁴ 王颐宁¹

¹ 广西大学农学院, 广西南宁 530004; ² 广西农业科学院玉米研究所, 广西南宁 530007; ³ 广西药用植物园, 广西南宁 530023; ⁴ 广西农业科学院经济作物研究所, 广西南宁 530007; ⁵ 商丘师范学院生物与食品学院, 河南商丘 476000

摘要: 为创造转基因雄性不育种质, 将缺失酶活性中心序列的红麻 *HcPDIL5-2a* 非全长基因通过花粉管通道法转化红麻保持系 722B, 获得了海南冬繁不育、南宁夏繁可育的低温敏雄性不育种质 722THS, 并从其姊妹交后代选育出了稳定型核不育(GMS)系 722HS; 此后, 又以 722HS 作母本, 以非转基因野生型 722B 为轮回亲本连续回交, 选育出了细胞质雄性不育系 722HA。对 722THS 与 722HA 的细胞学观察和线粒体 DNA 分子鉴定表明, 二者的小孢子败育时期均为双核期, 但 722HA 发生了线粒体 DNA 重排, 而 722THS 与 722B 的线粒体 DNA 保持不变。本研究结果为转基因创造作物雄性不育种质找到了一条新途径, 具有重要的科学意义和广阔的应用前景。

关键词: 红麻; 雄性不育; *HcPDIL5-2a* 非全长基因

Creation of male sterile germplasm using the partial length gene of *HcPDIL5-2a* in kenaf

ZHOU Bu-Jin^{1,2}, LI Gang³, JIN Gang⁴, ZHOU Rui-Yang^{1,*}, LIU Dong-Mei⁵, TANG Dan-Feng³, LIAO Xiao-Fang⁴, LIU Yi-Ding¹, ZHAO Yan-Hong⁴, and WANG Yi-Ning¹

¹ College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China; ² Maize Research Institute of Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China; ³ Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, Guangxi, China; ⁴ Cash Crop Institute of Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China; ⁵ Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan, China

Abstract: In order to create transgenic male sterile germplasm in kenaf, the partial length of gene *HcPDIL-2a* was transformed into maintainer line 722HB via pollen tube pathway. A low-temperature sensitive male sterile mutant called '722THS' was acquired, which showed sterile when grown in winter in Hainan and fertile when grown in summer in Nanning, and a stable Genic Male Sterile (GMS) line 722HS was selected from its sister progenies. A cytoplasmic male sterile line 722HA was bred by crossing the mutant 722THS with the wild type 722B. Cytological observation indicated that the microspore abortion of 722THS and 722HA both happened at dinuclear stage. The mitochondrial DNA molecular tag revealed that mitochondrial DNA rearrangement occurred in 722HA, while mitochondrial DNA of 722THS and 722B remained unchanged. This study provided a new way for the creation of male sterile germplasms, which had important scientific significances and broad application prospects.

Keywords: kenaf; male sterility; partial length *HcPDIL-2a*

红麻属于锦葵科木槿属一年草本作物, 耐旱、耐渍、耐盐碱, 抗逆性强, 生长速度快, 生物量大; 广泛用于造纸、可降解农膜及纺织麻袋、地毯及其他高档面料等^[1-3], 被誉为 21 世纪最具发展潜力的

生态环保型作物。

红麻以收获营养体(茎秆或韧皮纤维)为栽培目的, 杂种优势十分显著, 其杂交种比常规品种增产可高达 30%^[4-5], 但红麻雄性不育系的创制长期以来

本研究由国家自然科学基金项目(31571719)和广西自然科学基金项目(2018JJB130072)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31571719) and the Natural Science Foundation of Guangxi (2018JJB130072).

* 通信作者(Corresponding author): 周瑞阳, E-mail: ruiyangzhou@aliyun.com

第一作者联系方式: E-mail: zhou_bujin@163.com

Received (收稿日期): 2020-03-17; Accepted (接受日期): 2021-01-13; Published online (网络出版日期): 2021-01-22.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210122.0955.002.html>

是红麻育种的难点。早在 1976 年, 印度的 Ugale 首先报道了红麻细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterile, CMS)现象, 但此后未见进一步报道^[6], 也未见红麻杂交种在生产上推广利用。为利用红麻杂种优势, 中国农业科学院麻类研究所发明了红麻化学杀雄杂交制种技术, 但因成本太高只得利用杂种二代^[7]。2001 年, 周瑞阳在海南陵水冬繁的红麻野生种 UGP3 (引自中国农业科学院麻类研究所)中发现了 1 株雄性不育突变体 UG93S, 并于 2004 年鉴定了红麻 CMS 系 K03A, 2007 年又鉴定了 P3A、763A、917A、F3A、L23A 和 722A 等 6 个 CMS 系, 选育出红麻三系杂交种“红优 1 号”^[8]。此后, 中国农业科学院麻类研究所也报道了红麻细胞质雄性不育突变体的发现^[9]。

作物的杂种优势及抗性表现具有明显的细胞质效应, 因此创造多种 CMS 种质是作物杂种优势利用的重要目标。为此, 本团队在研究 UG93S 细胞质雄性不育机制的基础上, 开发出不育细胞质的分子标记^[10-11], 并对现有种质资源进行筛选发现, 源于非洲的红麻野生种 ZB90、KN250 和 KN142 (引自中国农业科学院麻类研究所)群体中均携带有不育细胞质, 但其表现型为雄性可育, 说明细胞核存在恢复基因阻碍了 CMS 性状的表达。由于红麻是常异花授粉作物, 所有品种资源在引进前均未进行自交提纯, 遂采用连续自交的方法分离出了新的红麻 CMS 种质 ZB90S、KN142S 和 KN250S, 并选育出一系列相应细胞质的 CMS 系^[11-14]。

由于自然存在的 CMS 种质十分有限, 按照育种家的意志创造 CMS 种质是作物杂种优势利用研究的热点和难点。前人研究表明, 蛋白质二硫键异构酶(protein disulphide isomerase, PDI)及其类蛋白(protein disulphide isomerase-like, PDIL)属于硫氧还蛋白超家族中的一员^[15], 在内质网初生肽链折叠中起着关键作用, 具有氧化、还原和二硫键异构化等功能; 同时作为分子伴侣介导蛋白酶的正确装配^[16]。研究表明, PDI 及其 PDIL 参与种子萌发与发育^[17]、逆境响应^[18]、雄性不育^[19-20]等多种生物学过程。在水稻中, 随着温度的升高, PDI 家族基因表达量明显上调; 与此同时, 当 PDI 家族基因表达受到抑制时, 其

表现出高温下花粉败育、结实率下降^[19]; 在拟南芥 *tms1-1* 突变体中, 由于 *TMS1* 基因(包含 PDI 结构域和 DNA J 结构域)缺失而表现出温敏雄性不育^[20]。但在杂交种生产中尚未见到此类雄性不育种质的利用, 也未见到利用该类基因创造 CMS 种质的报道。

为探索简便高效的作物转基因雄性不育种质创新方法, 本团队进行了长期的探索。李刚^[21]利用 iTRAQ 技术, 对红麻不育系 L23A 及保持系 L23B 线粒体蛋白质差异比较分析发现, PDIL 蛋白在不育系中显著上调。金刚等^[22]利用同源克隆和 RACE 技术克隆到一个红麻 *HcPDIL5-2a* (Hca.16G0019600), 半定量 RT-PCR 结果表明, *HcPDIL5-2a* 在不育系花药中的表达量高于保持系, 但在不育系根、花瓣、茎和叶等组织中的表达量低于保持系。表明 *HcPDIL5-2a* 在不育系小孢子败育过程中具有重要的功能。其生物信息学分析表明, *HcPDIL5-2a* 包含 1 个酶活性中心 WCGHC 结构域 a、2 个底物结合结构域 b 和 b'、Ca²⁺结合结构域 c。基于生物信息学分析分别构建红麻 *HcPDIL5-2a* 基因(简称“H”基因)和 *HcPDIL5-2a* 非全长基因(去除酶活性中心 WCGHC 结构域 a, 保留结构域 b 和 b'、结构域 c, 简称“PH”基因)超量表达载体并转化水稻发现, H 基因超量表达的转基因植株形态正常并且可育, 但 PH 基因超量表达的转基因植株育性明显较低^[22]。为此, 本研究采用花粉管通道法将该 PH 基因超量表达载体导入红麻保持系 722B, 以期创制红麻雄性不育系种质, 并为建立作物转基因雄性不育种质创新与方法体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试品种为保持系 722B (其原始材料 722 引自中国农业科学院麻类研究所), 完全叶。由于完全叶对裂叶为隐性性状, 以便于鉴别是否有生物学混杂。材料于 2010 年 7 月种植于广西大学实验实习农场。

1.1.2 载体质粒 红麻 *HcPDIL5-2a* 非全长基因(partial length *HcPDIL5-2a*, 简称“PH”)、质粒载体 PB1121-PH-GFP6 由本课题组金刚博士构建(图 1)^[12]。

图 1 PB1121-PH-GFP 质粒载体图谱

Fig. 1 Plasmid vector map of PB1121-PH-GFP

1.2 方法

1.2.1 花粉管通道法转化 722B 选取生长健壮、无病虫害的红麻植株, 将次日要开放的花蕾, 使用棉线等将花蕾顶部扎紧使其不能正常开放, 以防外来花粉污染; 花开之日早上 6:00, 松开棉线, 用卫生纸蘸取花粉涂抹到柱头上完成自交, 然后继续用棉线等捆扎花瓣, 继续防止外来花粉污染; 自花授粉 3~5 h 后即可形成花粉管通道, 此时即可去掉塑料夹子或棉线等捆扎物, 使花瓣张开, 同时用经过严格消毒处理过的微量进样器吸取 PBI121-PH-GFP 植物表达载体质粒 10 μL , 将针头沿着花粉管插入至子房中, 并将质粒注入子房中即完成超表达载体的微量注射; 待上述注射 PBI121-PH-GFP 植物表达载体质粒的果实自然成熟后, 单株上的同类种子合并编号, 即获得 T_0 代种子。

1.2.2 NPT II PCR 检测 根据 NPT II 序列设计 PCR 扩增引物, 引物序列: NPTII-F (5'-TGACTGGG CACAACAGACAAT-3'), NPTII-R (5'-CGGCGATAC CGTAAAGCAC-3')。PCR 反应体系包含 5 μL 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix (Vazyme, 中国南京)、NPT II-F 和 NPT II-R 各 0.3 μL 、1 μL 基因组 DNA (50 ng μL^{-1}), 加入 ddH₂O 至总体积 10 μL 。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min。

1.2.3 石蜡切片观察 在红麻现蕾期, 按照花蕾直径(bud diameter, BD, mm)大小分为 11 级, 分别为 BD<1.0、1.0 BD<1.5、1.5 BD<2.0、2.0 BD<2.5、2.5 BD<3.0、3.0 BD<3.5、3.5 BD<4.0、4.0 BD<4.5、4.5 BD<5.0、5.0 BD<5.5、BD 5.5。剥去萼片、花瓣, 在卡诺固定液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h, 取出花蕾, 70%酒精保存备用。按照石蜡切片程序: 梯度酒精(50%、70%、80%、90%、95%、100%、100%)脱水, 每级梯度 15 min; 梯度 TO (酒精: TO = 2: 1、酒精: TO = 1: 2、TO、TO)透明, 每级梯度 5 h; 梯度石蜡(TO: 石蜡 = 2: 1、TO: 石蜡 = 1: 2、石蜡、石蜡)透蜡, 前 3 级梯度 5 h, 第 4 级梯度 15 d; 石蜡包埋并切片, 切片厚度为 10 μm ; 铁矾-苏木精染色; 最后于莱卡 DMI3000B 显微镜观察照相。

1.2.4 数据分析 采用 SPSS Statistics 21.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 红麻转基因细胞核雄性不育(GMS)种质创新

2.1.1 转基因 GMS 突变体的发现及其形态特征

2010 年 10 月在广西大学实验实习农场将质粒载体 PBI121-PH-GFP 通过花粉管通道法, 转化至红麻保持系 722B 中, 并收获 T_0 代种子。2011 年在海南陵水播种上述 T_0 代种子获得 T_1 代植株, 结果发现了 2 株雄性不育株, 因其不育性表现低温敏, 遂命名为 722THS-1 及 722THS-2, 突变率为 0.36%。

将获得的 2 个细胞核雄性不育(genetic male sterility, GMS)突变体 722THS 与野生型 722B 及其 CMS 系 722A (UG93S 细胞质)比较发现, 在株高、株型、叶型叶色等方面, 突变型与野生型 722B 没有差异; 但是, 突变型的花器官与野生型 722B 存在明显区别。主要表现为: 722THS 花药较饱满, 但不能正常开裂散粉。而 CMS 系 722A 花药干瘪无花粉, 野生型 722B 的花药正常开裂散粉(图 2)。说明 722THS 为一种新的雄性不育种质。为保存该种质, 在南宁和海南播种进行了扦插繁殖。

图 2 红麻雄性不育突变体 722THS 与野生型 722B 及其 CMS 系 722A 花的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the flowers from 722THS, 722HB, and 722A in kenaf

2.1.2 转基因 GMS 小孢子发育过程的比较观察

为鉴定 GMS 突变型 722THS 小孢子败育特征, 本研究利用石蜡切片的方法分别观察花粉母细胞时期、四分体时期、单核期及双核期等 4 个时期花药的结构。花粉母细胞时期: 722THS 和 722B 两者的发育较为相似, 即花粉母细胞位于花粉囊腔的中央体积较大、细胞核明显、细胞质浓厚, 同时由内到外依次被绒毡层细胞、中间层、外皮层和内皮层紧密包裹(图 3-A, B)。四分体时期: 722THS 和 722B 小孢子及花药发育基本一致, 即花粉母细胞经过减数分裂形成四分体结构, 并被透明的胼胝质壁所包裹; 中间层细胞逐渐压缩, 绒毡层细胞膨大, 细胞质比

较浓厚(图 3-C, D)。单核期: 722THS 和 722B 小孢子及花药发育同样无差异, 即花粉囊腔变大, 绒毡层细胞开始降解; 包裹四分体的胼胝质被降解并释放出小孢子; 小孢子近圆形、体积明显增大、外壁增厚表面出现棘突, 同时开始出现中央大液泡, 细胞核逐渐被液泡挤向细胞壁(图 3-E, F)。双核期: 722THS 和 722B 小孢子表现出明显的差异(图 3-G, H)。两者的花粉囊腔进一步变大, 花药绒毡层基本降解完全, 小孢子都呈现出近圆形壁表面有棘突; 但是, 722THS 小孢子细胞质明显比较稀薄(图 3-H, 箭头)。

2.1.3 转基因 GMS 遗传特征 为分析红麻 722THS 突变体的遗传规律, 2011 年在海南将 722THS 与其野生型 722B 杂交。2011 年 7 月, 在南宁播种 1/2 种子, 结果发现, 所有杂交 F_1 代均表现正常可育; 2012 年 1 月, 海南陵水播种上年留存的 1/2 种子, 也表现正常可育; 2012 年 7 月, 在南宁播种 F_2 代, 同样表现正常可育(表 1), 未见到不育株分离。是外源基因丢失? 还是不育表现为隐性性状, 并表现海南冬繁不育、南宁夏繁可育的低温敏感特征? 尚不清楚。

图 3 红麻突变体 722THS 及野生型 722B 小孢子发育观察
Fig. 3 Microspore development observation of mutant 722THS and wild type 722B in kenaf

表 1 红麻 722THS/722B 杂交 F_1 和 F_2 育性统计
Table 1 Fertility statistics of 722THS/722B hybrid F_1 and F_2

杂交组合 Cross	可育株数 Number of fertile plants	不育株数 Number of sterile plants
722THS-1/722B	86	0
722THS-2/722B	113	0
(722THS-1/722B)自交 (722THS-1/722B) selfing	130	0
(722THS-2/722B)自交 (722THS-2/722B) selfing	95	0

为检测外源基因是否丢失, 本研究在海南省陵水县播种 2012 年南宁 722THS 自然杂交 F_1 代, 其中 4 株雄性不育植株, 利用标记基因 *NPT II* 引物进行 PCR 检测发现, 4 个不育株均能扩增出目的条带(图 4), 表明外源基因没有丢失, 不育与外源基因有关。

由于 722THS 表现为花药不开裂, 不能散粉, 但花药外部形态和大小正常, 四分体大小正常, 圆形, 较为饱满, 但内容物明显不足, 推测 722THS 的不育性与花粉内淀粉含量不足有关。为证实这一推测, 本研究于 2013 年 3 月上旬对 4 株雄性不育植株进行

环割。15 d 后发现, 所有环剥株均由不育转变为可育, 且自交结实。为此将其分为 2 份分别播于南宁和海南陵水, 以检测光温效应。

2013 年, 在南宁播种上述环剥可育自交后代发现, 31 株中有 6 株不育和 25 株可育。*NPT II* 检测表明, 所有不育株均能检测到目的基因; 而 18 株可育株中, 只有 11 株能检测到目的条带(图 5), 表明, 转基因植株可能为单基因插入并且为隐性性状。2014 年, 在海南陵水播种后代发现, 开花初期可育株与不育株的数量明显无规律; 但随着气温升高和日照延长, 部分不育株的育性发生了转变, 统计学分析

图 4 722THS 自然杂交 F₁ 代不育株 PCR 检测
Fig. 4 PCR detection of 722THS natural hybrid F₁ sterile plants
M: DNA marker; 1: 阳性质粒; 2: 阴性对照; 3~6: 不育株。
M: DNA marker; 1: positive plasmid; 2: negative control; 3~6: sterile plants.

表明, 可育株与不育株数量比约为 3 : 1, 符合卡方

检验(表 2)。由此进一步证实, 雄性不育性为外源基因所致, 低温敏雄性不育性为单基因隐性性状, 且环剥可代替长日高温的效应, 使其恢复育性。

为保存 THS 种质, 利用姊妹交保持, 并采用南宁春播和秋播对育性作进一步鉴定发现, 春播的部分姊妹交后代也表现出育性分离现象, 但根据 THS 的育性表现特征, 春播红麻因开花时温度较高, 应全部恢复雄性可育, 只有在南宁秋播和海南冬繁条件下才表现雄性不育分离。说明 THS 的育性表现与其姊妹交父本有关, 受遗传背景的影响, 或者与其他基因发生互作。为此, 本研究选育出南宁秋播和海南冬繁不育的低温敏 GMS 系 722THS, 及南宁春播、秋播和海南冬繁条件下均表现雄性不育的稳定 GMS 系 722HS, 并采用姊妹交保持的方法建立了不育 : 可育为 1 : 1 的永久分离系统, 以为进一步的研究

图 5 722THS 环割可育自交后代 *NPT II* 检测(广西南宁)
Fig. 5 *NPT II* detection of fertile self-progeny after girdling of 722THS in Nanning of Guangxi
M: DNA marker; 1~6 为不育株; 7~31 为可育株。
M: DNA marker; 1~6: sterile plants; 7~31: fertile plants.

表 2 722THS 海南环割可育自交后代育性统计(海南)

Table 2 Fertility statistics of fertile self-progeny after girdling of 722THS in Hainan

统计时间 Count date	平均气温 Average temperature (°C)	杂交组合 Hybrid combination	可育株数 Number of fertile plants	不育株数 Number of sterile plants	期望比例 Expect proportion	χ^2	显著性测验 Significance test $\chi^2_{(0.05,1)}$
开花初期 (3 月 14~16 日) Early flowering (from March 14 to 16)	23.3	722THS-S1 环割可育自交 722THS-S1 girdling fertile selfing	123	91	3:1	35.05	NS
		722THS-S2 环割可育自交 722THS-S2 girdling fertile selfing	263	193	3:1	72.99	NS
		722THS-S3 环割可育自交 722THS-S3 girdling fertile selfing	133	101	3:1	41.17	NS
		722THS-S4 环割可育自交 722THS-S4 girdling fertile selfing	17	44	3:1	61.55	NS
		722THS-S1 环割可育自交 722THS-S1 girdling fertile selfing	158	56	3:1	0.24	*
		722THS-S2 环割可育自交 722THS-S2 girdling fertile selfing	324	122	3:1	1.50	*
开花后期 (4 月 11~13 日) Late flowering (from April 11 to 13)	27.5	722THS-S3 环割可育自交 722THS-S3 girdling fertile selfing	163	71	3:1	3.56	*
		722THS-S4 环割可育自交 722THS-S4 girdling fertile selfing	43	18	3:1	0.66	*
		722THS-S1 环割可育自交 722THS-S1 girdling fertile selfing	158	56	3:1	0.24	*
		722THS-S2 环割可育自交 722THS-S2 girdling fertile selfing	324	122	3:1	1.50	*

提供材料。观察发现, 722HS 与 722THS 的败育时期和败育特征相同, 但环剥不能诱导 722HS 恢复育性。

2.2 基于转 *PH* 基因 GMS 种质选育 CMS 系 722HA

2.2.1 质核同源与质核异源 CMS 系的创制 以上述 722HS-S (722HS 永久分离系统中的不育) 株为母本与系统外的 722B 不同株系为父本分别进行杂交发现, 部分 722B 株系的杂交后代表现 GMS 特征, 而另一部分 722B 株系的杂交后代全部表现雄性不育, 说明为细胞质遗传。通过饱和和回交的方法选育出质核均源于 722B 的质核同源 CMS 系 722HA。基于这一特性, 又以 722HS-S 为母本与 722B 以外的保持系(与转基因供体材料没有亲缘关系的雄性不育保持系)杂交并饱和和回交选育出了质核异源 CMS 系。

2.2.2 722HA 的花器官形态与败育特征观察 盛花期, 观察 722HA 及其保持系 722HB (与 722B 为同一材料, 但因此处其所对应的 CMS 系为 722HA, 故如此称之) 花的形态特征发现, 722HA 的花冠形状、花瓣颜色、雄蕊着生位置、柱头外露程度、花药颜色及花药饱满程度均与 722HB 相同, 但花药完全不开裂, 没有成熟花粉粒释放出来(图 6)。花粉母细胞时期: 722HA 和 722HB 的细胞学特征基本相似, 即初生壁细胞都能够正常分化, 由外至内依次为外皮层、内皮层、中间层和绒毡层; 初生造孢细胞有丝分裂为小孢子母细胞(花粉母细胞), 花粉母细胞位于花粉囊腔中央, 被绒毡层细胞紧密包裹, 其体积较大、细胞核明显、细胞质营养物质丰富(图 7-A1, B1)。四分体时期: 722HA 和 722HB 的发育均比较正常, 花粉母细胞经过 2 次减数分裂形成小孢子四分

体, 其周围被透明的胼胝质所包裹; 花粉囊由小孢子四分体、绒毡层、中间层、内皮层及外皮层组成, 绒毡层细胞变大、细胞质丰富, 中间层细胞被压缩(图 7-A2, B2)。单核期: 722HA 和 722HB 花药细胞学结构开始出现差异, 两者的花粉囊都逐渐变大; 绒毡层细胞都开始降解, 但 722HA 的绒毡层细胞降解速度明显比 722HB 的快; 包裹小孢子四分体的胼胝质被绒毡层细胞降解产生的胼胝质酶所酶解, 并释放出单核小孢子(图 7-A3, B3)。双核期: 722HA 和 722HB 花药细胞学结构表现出明显的差异, 722HA 和 722HB 的绒毡层细胞都基本完全降解; 其次, 它们的花粉囊都进一步变大, 722HB 花药囊腔壁较薄, 而 722HA 花药囊腔壁明显较厚; 最后, 722HB 的双核期小孢子含有丰富的营养物质, 但 722HA 的双核期小孢子的营养物质明显较少(图 7-A4, B4)。成熟花粉粒时期: 722HA 和 722HB 的花粉粒和花粉囊腔壁同样表现出明显差异, 722HA 和 722HB 的成熟花粉粒大小没有差异, 722HB 的成熟花粉粒表面的刺状突起较大, 花粉粒中含有丰富的内容物来为花粉的萌发提供足够的营养物质, 但是 722HA 的花粉粒表面的刺状突起较小, 花粉粒中出现了质壁分离的现象; 其次, 722HB 的花粉囊腔壁较薄, 722HA 的花粉囊腔壁明显较厚(图 7-A5, B5)。

2.2.3 722HA 线粒体 DNA 鉴定 为鉴定 722HA 的线粒体 DNA 是否发生重排, 本研究利用本实验室前期开发的 2 个线粒体基因 *atp9* (MM556) 和 *atp6* (MM509) 的分子标签进行鉴定发现, MM509 和 MM556 的鉴定结果完全一致, 即 722B 及 GMS 突变体 722THS 为可育, 而 UG93S 细胞质 CMS 系 722A 和 722THS 细胞质 CMS 系 722HA 均为不育(图 8)。

图 6 红麻 722HA、722HB 花的形态特征^[23]

Fig. 6 Morphological characteristics of the flowers from 722HA and 722HB in kenaf^[23]

图 7 红麻 722HA 及 722HB 小孢子发育观察^[23]

Fig. 7 Microspore development observation of 722HA and 722HB in kenaf^[23]

PMC: 花粉母细胞; Td: 四分体小孢子; Ms: 单核期小孢子; Ds: 双核期小孢子; MP: 成熟花粉粒; Ep: 外皮层; En: 内皮层; ML: 中间层; T: 绒毡层; 比例尺为 20 μm 。

PMC: pollen mother cell; Td: tetrad microspore; Ms: mononuclear microspore; Ds: dinuclear microspore; MP: mature pollen grain; Ep: epidermis; En: endothecium; ML: middle layer; T: tapetum; Bar: 20 μ m.

同时对上述条带进行回收测序, 序列比对结果表明 722HA 与 722A 序列一致, 722THS 与 722B 序列一致 (图 9)。由此推测, 722HA 与 722THS 相比发生了线粒体 DNA 重排。

2.2.4 722HA 恢保关系分析 为了解 722HA 与 UG93S 细胞质 CMS 系 722A 的恢保关系是否一致, 本研究以前期鉴定出的 722A 恢复系福红 992 (引自福建农林大学)和 R7 (引自中国农业科学院麻类研究所)为父本分别与 722A 和 722HA 杂交发现, 722HA 与福红 992 和 R7 杂交后代均存在不育株(S)与可育株(F)分离(表 3), 说明其不能被 722A 的恢复系 992 和 R7 完全恢复。尽管 2 个不育胞质分子标签 722HA

与 722A 序列一致,但恢保关系不同,在一定程度上表明,二者分属 2 个不同的 CMS 系统。

图 8 分子标签 MM509、MM556 检测不同材料的胞质类型

Fig. 8 Cytoplasmic types detection of different materials using molecular tags MM509 and MM556

M: DNA marker; 1~4 分别为 722A、722HA、722B 和 722THS。
M: DNA marker; 1, 2, 3, 4 represent 722A, 722HA, 722B, and 722THS, respectively.

	Genomic coordinates	Sequence	Position
722A	1000000000	TATGTTTGTAAATATCACGTCGCGATTAATTTCTTTT.....TGGTGCAAAAAACGTTTGGCAGAACT	65
722HA	1000000000	TATGTTTGTAAATATCACGTCGCGATTAATTTCTTTT.....TGGTGCAAAAAACGTTTGGCAGAACT	65
722B	1000000000	TATGTTTGTAAATATCACGTCGCGATTAATTTCTTTTGTGTTTTGTTTTTGGTCCGCAAAAAACGTTTGGCAGAACT	80
722THS	1000000000	TATGTTTGTAAATATCACGTCGCGATTAATTTCTTTTGTGTTTTGTTTTTGGTCCGCAAAAAACGTTTGGCAGAACT	80
Consensus		tatgtttgttaaatatcacgtcgcgattaatttcttttgttttgggttgcaaaaaacggttgcagaaact	
722A	1000000000	GCCTGTAGTAGTGTGCAGGATGGGAGTGGTGTAACCTATATATTTTATTCCAAATTCGAATTGATGATTTCCCGCAGACATCAT	145
722HA	1000000000	GCCTGTAGTAGTGTGCAGGATGGGAGTGGTGTAACCTATATATTTTATTCCAAATTCGAATTGATGATTTCCCGCAGACATCAT	145
722B	1000000000	GCCTGTAGTAGTGTGCAGGATGGGAGTGGTGTAACCTATATATTTTATTCCAAATTCGAATTGATGATTTCCCGCAGACATCAT	157
722THS	1000000000	GCCTGTAGTAGTGTGCAGGATGGGAGTGGTGTAACCTATATATTTTATTCCAAATTCGAATTGATGATTTCCCGCAGACATCAT	157
Consensus		gctgtagtagtgtgcaggatgggagtggtgtaacctatatatttatttccaaatgaattgatgattcccgacactcat	
722A	1000000000	GGAGTTTCTTGAGCACTACTCTGGGCTTTACCCCGTCCAGTGAACGATATAGTAGAGCTCGGAAGTGATATCCACGAGAAAGT	225
722HA	1000000000	GGAGTTTCTTGAGCACTACTCTGGGCTTTACCCCGTCCAGTGAACGATATAGTAGAGCTCGGAAGTGATATCCACGAGAAAGT	225
722B	1000000000	GGAAATTTCTGAGTACTACTCTGGGCTTTACCCCGTCCAGTGAACGATATAGTAGAGCTCGGAAGTGATATCCACGAGAAAGT	237
722THS	1000000000	GGAAATTTCTGAGTACTACTCTGGGCTTTACCCCGTCCAGTGAACGATATAGTAGAGCTCGGAAGTGATATCCACGAGAAAGT	237
Consensus		ggaatttctgaggacactactctgggcttgaccggtccagtgaaactgatagtagagctcggaagtgatattccacgagaaaagt	
722A	1000000000	AGAAGAATTAGTGTAAAGAACCTACGTCGGGGGGTCCGAGAAGACATCGTTACTGCTATCTCCGAAGACTTTACACGGGGGAAA	305
722HA	1000000000	AGAAGAATTAGTGTAAAGAACCTACGTCGGGGGGTCCGAGAAGACATCGTTACTGCTATCTCCGAAGACTTTACACGGGGGAAA	305
722B	1000000000	AGAAGAATTAGTGTAAAGAACCTACGTCGGGGGGTCCGAGAAGACATCGTTACTGCTATCTCCGAAGACTTTACACGGGGGAAA	317
722THS	1000000000	AGAAGAATTAGTGTAAAGAACCTACGTCGGGGGGTCCGAGAAGACATCGTTACTGCTATCTCCGAAGACTTTACACGGGGGAAA	317
Consensus		aqaagaattagtgttaagaacctacgtcgggggtccgaagaagacatcgttactgctatctccgaagacttacacggggaaa	

(图 9)

图 9 分子标签 MM509、MM556 在不同材料中的序列比对
Fig. 9 Sequence alignment of molecular tags MM509 and MM556 in different materials
A: 分子标签 MM509 序列比对结果; B: 分子标签 MM556 序列比对结果。
A: sequence alignment with molecular tag MM509; B: sequence alignment with molecular tag MM556.

表 3 红麻 CMS 系 722HA、722A 与恢复系杂交后代育性统计
Table 3 Fertility statistics of hybrid progenies from kenaf CMS line 722HA and 722A with restoring lines

组合 Cross	可育株数 Number of fertile plants	不育株数 Number of sterile plants
722A/福红 992 722A/Fuhong 992	56	0
722A/R7	91	0
722HA/福红 992 722HA/Fuhong 992	52	14
722HA/R7	44	35

3 讨论

3.1 转 *PH* 基因创造雄性不育种质的可能机理

由于红麻 *PH* 基因缺失酶活性中心, 如将其导入红麻, 必然与内源 *H* 基因竞争同一底物。为明确其共同作用底物, 本课题组利用酵母双杂交技术筛选到 1 个与 *H* 和 *PH* 基因均发生互作的热激蛋白基因 *HcHsp40/HcDNA J* (结果待发表)。前人研究结果表明, 在真核生物中, *Hsp40* 的 *DNA J* 结构域与 *Hsp70* 的 *ATP* 酶结构域相互作用并激活 *ATP* 酶活性^[24]。热激蛋白不但可缓解逆境胁迫所致的过量活性氧(reactive oxygen species, ROS)伤害, 而且可保护线粒体 *DNA* (mtDNA) 的稳定性^[25]。高水平的 ROS 可导致 mtDNA 断裂, 破坏其结构和功能^[26]; 同时 ROS 也可以诱发 mtDNA 的点突变、缺失和插入^[27-28], 导致 CMS 的发生。

3.2 转 *PH* 基因可创造多种雄性不育种质

基于 *PH* 与内源 *H* 竞争同一热激蛋白 *HcHsp40*, 故可用 *PH/H* 比值对转 *PH* 基因创造多种雄性不育种质的多样性作出解释: 由于长期以来对 *H* 及其相关蛋白表达量的基因型差异与环境敏感性未作鉴定与选择, 不同品种甚至同一品种不同株系之间必然存在基因型分化。如果 *PH/H* 较高且稳定, 有功能 *HcHsp40* 较低而直接导致 mtDNA 重排, 形成 CMS; 反之, 如果 *PH/H* 较低, 则导入 *PH* 无效。对于长日高温敏感材料, 低温下的 *PH/H* 不足以导致 mtDNA 重排而表现 GMS, 但长日高温下 *H* 上调, 育性恢复, 形成低温敏 GMS; 反之, 如果表现钝感, 则稳定表现 GMS。如果 GMS 与低 *H* 株系杂交并回交, 将导致 *PH/H* 大幅提高而转变为 CMS。转 *PH*-GMS 与同源细胞核供体杂交既可表现 GMS, 也可表现 CMS, 与内源 *H* 表达有关; 而与异源细胞核供体杂交后代均表现为 CMS。为发现进一步的证据, 用花粉管通道法将红麻 *PH* 基因导入水稻和棉花均直接创造出了 CMS 种质^[29-30]。说明利用 *PH* 基因创造雄性不育种质具有可靠性和广谱性的特点。但其机制仍需进一步研究。

3.3 转基因 CMS 种质创新的育种利用价值

关于 GMS 转换为 CMS 的现象, 国内外只查到 2 篇文献报道。范树国等^[31]利用组织培养方法, 获得无花粉型南广占 GMS 水稻单株, 并与保持系多代回交使其转变为 CMS。牛景等^[32]在组培过程中利用诱变, 将光敏核不育水稻杂种诱变为 CMS 种质^[32]。但其并非转基因创造, 更未见到相关基础研究的报道。

目前, 在生产上利用的 CMS 种质资源主要是从自然界发现的突变体或远缘杂交后代产生。而自然发生的 CMS 种质有限, 远缘杂交又难以成功和细胞质的母性遗传特征又限制了杂交种产量的持续提高。由于转基因不受物种限制, 通过转基因方法创造 CMS 种质是作物杂种优势利用发展到高级阶段的必然选择。但前人通过转基因方法创制的一般是细胞核雄性不育种质, 且创制和利用程序复杂, 技术要求高。因转基因 CMS 的同源保持系是其非转基因野生型, 由此可选育出质核同源(质核源于同一品种) CMS 系, 也可与其他保持系饱和回交选育出质核源于不同品种的质核异源 CMS 系。因质核同源 CMS 系与其同源保持系仅存在细胞质不育基因或少数相关基因差异, 因而有利于排除线粒体基因背景的干扰而发掘出雄性不育关键基因; 同时, 因保持系与恢复系杂交组合的优势表现普遍优于 CMS 系与恢复系杂交组合, 说明同一品种的质核互作是植物长期进化过程中形成的优化质核互作配置, 因此, 利用质核同源 CMS 系有利于组配出强优势组合; 且因转基因 CMS 的保持系为非转基因品种/系, 在其高回交世代已不存在外源基因和质粒, 因而不存在转基因作物的生态风险和管理限制, 是雄性不育种质创新方法的重大突破, 具有十分广阔的应用前景。

4 结论

首次采用花粉管通道法将缺失酶活性中心序列的红麻 *HcPDIL5-2a* 非全长基因转化红麻保持系 722B, 创造出了低温敏雄性不育种质 722THS, 通过姊妹交选育出了稳定型核不育系 722HS, 与非转基因野生型连续回交, 选育出了细胞质雄性不育系 722HA, 为转基因创造作物雄性不育种质找到了一条新途径, 具有重要的科学意义和广阔的应用前景。

References

- [1] 史春霞, 白洋, 郁崇文, 黄. 红麻资源的优化与开发利用. 中国麻作, 2001, 24(1): 40-44.
Shi C X, Bai Y, Yu C W. Optimization and development of jute and kenaf resources. China's Fiber Crops, 2001, 24(1): 40-44 (in Chinese).
- [2] 程舟, 鮫岛一彦, 陈家宽. 日本的红麻研究、加工和利用. 中国麻业, 2001, 23(3): 16-24.
Cheng Z, Samejima K, Chen J K. Kenaf research, processing and utilization in Japan. Plant Fiber Prod, 2001, 23(3): 16-24 (in Chinese).

- [3] 陶爱芬, 张晓琛, 祁建民. 红麻综合利用研究进展与产业化前景. 中国麻业科学, 2007, 29(1): 2–6.
Tao A F, Zhang X C, Qi J M. Research progress and industrialization prospect of the comprehensive utilization in kenaf. *Plant Fiber Sci China*, 2007, 29 (1): 2–6 (in Chinese).
- [4] Srivastava S K, Pandey B P B, Lal R S. Combining ability in a six-parent diallel cross in Mesta. *Ind J Agric Sci*, 1978, 49: 724–740.
- [5] Pace S, Piscioneri I, Settanni I. Heterosis and combining ability in a half diallel cross of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) in south Italy. *Ind Crops Prod*, 1998, 7: 417–427.
- [6] Ugale S D, Khuspe S S. Cytoplasmic genetic male sterility in *Hibiscus cannabinus* L. *J Maharashtra Agric Univ*, 1976, 1: 102–106.
- [7] 汤永海, 李德芳. 红麻杂种二代利用的研究和探讨. 中国麻作, 1991, (3): 4–9.
Tang Y H, Li D F. Study on the utilization of hybrids second generation in kenaf. *China's Fiber Crops*, 1991, (3): 4–9 (in Chinese).
- [8] 周瑞阳, 张新, 张加强, 甘正华, 韦汉西. 红麻细胞质雄性不育系的选育及杂种优势利用取得突破. 中国农业科学, 2008, 41: 314.
Zhou R Y, Zhang X, Zhang J Q, Gan Z H, Wei H X. A breakthrough in kenaf cytoplasmic male sterile lines breeding and heterosis utilization. *Sci Agric Sin*, 2008, 41: 314 (in Chinese with English abstract).
- [9] 李德芳, 陈安国, 唐慧娟. 红麻质核互作型雄性不育系的发现及初步创制. 中国麻业科学, 2007, 29(2): 78.
Li D F, Chen A G, Tang H J. Discovery and creation of cytoplasmic and nuclear benetic male sterility in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Plant Fiber Sci China*, 2007, 29(2): 78 (in Chinese).
- [10] Zhao Y H, Chen P, Liao X F, Zhou B J, Liao J, Huang Z P, Kong X J, Zhou R Y. A comparative study of the *atp9* gene between a cytoplasmic male sterile line and its maintainer line and further development of a molecular marker specific for male sterile cytoplasm in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Mol Breed*, 2014, 42: 969–976.
- [11] Zhao Y H, Liao X F, Zhou B J, Zhao H T, Zhou Y Y, Zhou R Y. Mutation in the coding sequence of *atp6* are associated with male sterile cytoplasm in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Euphytica*, 2016, 207: 169–175.
- [12] 陈鹏, 周琼, 周瑞阳, 赵艳红, 廖小芳, 周步进, 何冰. 利用红麻 ZB90 的不育细胞质选育雄性不育系的方法. 中国专利: ZL 201310710624.8. 2013-12-19.
Chen P, Zhou Q, Zhou R Y, Zhao Y H, Liao X F, Zhou B J, He B. The method of breeding male sterile line using ZB90 sterile cytoplasm in kenaf. Chinese patent: ZL 201310710624.8. 2013-12-19 (in Chinese).
- [13] 赵艳红, 廖小芳, 周瑞阳, 陈鹏, 周琼, 周步进. 利用红麻 KN250 的不育细胞质选育雄性不育系的方法. 中国专利: ZL 201310714202.8. 2013-12-19.
Zhao Y H, Liao X F, Zhou R Y, Chen P, Zhou Q, Zhou B J. The method of breeding male sterile line using KN250 sterile cytoplasm in kenaf. Chinese patent: ZL 201310714202.8. 2013-12-19 (in Chinese).
- [14] 廖小芳, 赵艳红, 周瑞阳, 陈鹏, 周琼, 周步进. 利用红麻 KN142 的不育细胞质选育雄性不育系的方法. 中国专利: ZL 201310711047.4. 2013-12-19.
Liao X F, Zhao Y H, Zhou R Y, Chen P, Zhou Q, Zhou B J. The method of breeding male sterile line using KN142 sterile cytoplasm in kenaf. Chinese patent: ZL 201310711047.4. 2013-12-19 (in Chinese).
- [15] Ferrari D M, Soling H D. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J*, 1999, 339: 1–10.
- [16] Freedman R B, Hirst T R, Tuite M F. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19: 331–336.
- [17] Han X H, Wang Y H, Liu X, Jiang L, Ren Y L, Liu F, Peng C, Li J J, Jin X M, Wu F Q. The failure to express a protein disulphide isomerase-like protein results in a floury endosperm and an endoplasmic reticulum stress response in rice. *J Exp Bot*, 2012, 63: 121–130.
- [18] Wang X, Chen J, Liu C A, Luo J L, Yan X, Ai A H, Cai Y H, Xie H W, Ding X, Peng X J. Over-expression of a protein disulfide isomerase gene from *Methanothermobacter thermautotrophicus*, enhances heat stress tolerance in rice. *Gene*, 2019, 684: 124–130.
- [19] 耿威. 蛋白二硫键异构酶基因沉默和超表达对水稻高温结实和品质性状影响. 浙江大学硕士学位论文, 浙江杭州, 2015.
Geng W. Influence of High Temperature on Rice Pikelet Fertility and Grain Quality in Relation to Protein Disulfide Isomerase (PDI) Gene Silencing and Over-expression. MS Thesis of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [20] Yang K Z, Xia C, Liu X L, Dou X Y, Wang W, Chen L Q, Zhang X Q, Xie L F, He L Y, Ma X, Ye D. A mutation in Thermosensitive Male Sterile 1, encoding a heat shock protein with DnaJ and PDI domains, leads to thermosensitive gametophytic male sterility in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, 57: 870–882.
- [21] 李刚. 红麻细胞质雄性不育系线粒体蛋白质组差异分析与不育相关基因的发掘. 广西大学博士学位论文, 广西南宁, 2009.
Li G. Analysis of Mitochondrial Proteomic Differences and Discovery of Related Genes in Cytoplasmic Male Sterility in Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). PhD Dissertation of Guangxi University, Nanning, Guangxi, China, 2009 (in Chinese with English abstract).
- [22] 金刚. 红麻 CMS 胞质的 SNP 标记转化及不育系和保持系表达差异的研究. 广西大学博士学位论文, 广西南宁, 2011.
Jin G. Conversion of SNP Markers Associated with CMS Cytoplasm and Differential Expression Analysis in Anther of CMS and Its Maintainer Line of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). PhD Dissertation of Guangxi University, Nanning, Guangxi, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [23] Zhou B J, Liu Y D, Chen Z X, Liu D M, Wang Y N, Zheng J, Liao X F, Zhou R Y. Comparative transcriptome analysis reveals the cause for accumulation of reactive oxygen species during pollen abortion in cytoplasmic male-sterile kenaf line 722HA. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 5515.
- [24] Kroczyńska B, Blond S Y. Cloning and characterization of a new soluble murine J-domain protein that stimulates BiP, Hsc70 and DnaK ATPase activity with different efficiencies. *Gene*, 2001, 273: 267–274.
- [25] Xu S, Ding H, Sang J R. Reactive oxygen species, metabolism,

- and signal transduction in plant cells. *Acta Bot Yunnanica*, 2007, 29: 355–365.
- [26] Wallace D C. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, 2010, 51: 440–450.
- [27] Kumar M, Pathak D, Kriplani A, Ammini A C, Talwar P, Dada R. Nucleotide variations in mitochondrial DNA and supra-physiological ROS levels in cytogenetically normal cases of premature ovarian insufficiency. *Arch Gynecol Obstet*, 2010, 282: 695–705.
- [28] Venkatesh S, Deecaraman M, Kumar R, Shamsi M B, Dada R. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian J Med Res*, 2009, 129: 127–137.
- [29] 周瑞阳, 刘冬梅. 棉花转基因创制细胞质雄性不育系的方法. 中国专利: ZL 201710061030.7. 2017-01-25.
Zhou R Y, Liu D M. The method of creating cytoplasmic male sterile line by transgene in cotton. Chinese Patent: ZL 201710061030.7. 2017-01-25 (in Chinese).
- [30] 周瑞阳, 汤丹峰. 水稻转基因创制细胞质雄性不育系的方法. 中国专利: ZL 201710061028.X. 2017-01-25.
Zhou R Y, Tang D F. The method of creating cytoplasmic male sterile line by transgene in rice. Chinese Patent: ZL 201710061028.X. 2017-01-25 (in Chinese).
- [31] 范树国, 梁承邺, 刘鸿先. 离体条件下核不育水稻突变为细胞质雄性不育. 植物学报, 2000, 17: 548–554.
Fan S G, Liang C Y, Liu H X. *In vitro* mutation of rice from GMS to CMS. *Chin Bull Bot*, 2000, 17: 548–554 (in Chinese with English abstract).
- [32] 牛景, 牛芝霞. 光敏核不育水稻杂种 F_2 花药培养中获得了细胞质不育突变体. 杂交水稻, 2001, 16(2): 42.
Niu J, Niu Z X. A cytoplasmic male sterile mutant was obtained from the anther culture of the F_2 of a cross of photoperiod sensitive genic male sterile rice. *Hybrid Rice*, 2001, 16(2): 42 (in Chinese with English abstract).