DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04153

绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1* 的遗传学与细胞学分析

吴然然 林 云 陈景斌 薛晨晨 袁星星 闫 强 高 莹
李灵慧 张勤雪 陈 新*

江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏南京 210014

摘 要: 单产水平低一直是我国绿豆存在的产业问题。绿豆杂种优势显著是提高产量的有效途径, 而雄性不育材料是实现杂种利用的宝贵资源。本研究利用 ^{60}Co - γ 辐射诱变技术首次在绿豆中获得雄性不育突变体, 并命名为‘不育绿豆 2015-1’ (*male sterile mungbean2015-1*, 简称为 *msm2015-1*)。 *msm2015-1* 营养生长期表型与‘苏绿 1 号’没有明显差异。花器官形态正常, 但花药发白且不能正常开裂散粉, 成熟期座荚率几乎为 0。遗传分析显示, 育性分离群体中可与不育分离比符合 3:1, 表明不育性状由单个隐性核基因控制。花粉发育的细胞学分析发现, *msm2015-1* 的盛开花朵中花粉粒几乎未在柱头附着, 体外亦未萌发。花粉细胞质未被 Alexander 染液正常着色, I_2 -KI 染色出现典败、圆败和染败 3 种类型。DAPI 染色显示, *msm2015-1* 花粉细胞核发育异常。醋酸洋红染色表明, 败育发生在花粉发育早期, 花粉母细胞在四分体时期减数分裂的不对称和异常多分裂是导致花粉败育的主要原因。

关键词: 绿豆; 雄性不育; 遗传分析; 花粉发育; 细胞学

Genetic and cytological analysis of male sterile mutant *msm2015-1* in mungbean

WU Ran-Ran, LIN Yun, CHEN Jing-Bin, XUE Chen-Chen, YUAN Xing-Xing, YAN Qiang, GAO Ying, LI Ling-Hui, ZHANG Qin-Xue, and CHEN Xin*

Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

Abstract: In China, the low yield per unit has always been a problem in the mungbean industry. The heterosis of mungbean is an effective way to increase yield. The male sterile line is a valuable resource to realize the utilization of hybrid. In this study, ^{60}Co - γ radiation mutagenesis technology was used to induce male sterile mutants in mungbean, and we gained one mutant named *male sterile mungbean 2015-1* (*msm2015-1*) for the first time. There was no significant phenotype difference between *msm2015-1* and Sulyu 1 during the vegetative growth stage. The floral organ of *msm2015-1* was normal, but the anthers of *msm2015-1* were white and could not crack and disperse powder normally in the flowering stage. In the mature stage, hardly any normal pods grew up. Genetic analysis showed the separation ratio of fertility and sterility in the fertile segregation population was in line with 3:1, indicating that the sterility trait was controlled by a single recessive nuclear gene. Cytological analysis of pollen development revealed that there were few pollen grains of *msm2015-1* attached to mature stigmas. The pollen grains of *msm2015-1* did not germinate *in vitro*. The cytoplasm of *msm2015-1*'s pollen could not be stained by Alexander dye. Three abortion types showed up when stained by I_2 -KI dye: typical abortion, spherical abortion and stained abortion. DAPI staining showed the nuclei of *msm2015-1*'s pollen developed abnormally. Magenta acetate staining indicated that abortion occurred in the early stage of pollen development, while the asymmetry and more anomalous fission of meiosis during the tetrad stage were the main causes of pollen abortion.

Keywords: mungbean; male sterile; genetic analysis; pollen development; cytology

本研究由国家重点研发计划项目(2019YFD1001301, 2019YFD1001300), 江苏省自然科学基金项目(BK20190257), 国家自然科学基金项目(31871696)和江苏特粮特经产业技术体系集成创新中心(JATS[2019]399)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFD1001301, 2019YFD1001300), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20190257), the National Natural Science Foundation of China (31871696), and the Jiangsu Agricultural Industry Technology System (JATS[2019]399).

* 通信作者(Corresponding author): 陈新, E-mail: cx@jaas.ac.cn

第一作者联系方式: E-mail: rrwu@jaas.ac.cn

Received (收稿日期): 2020-07-11; Accepted (接受日期): 2020-10-14; Published online (网络出版日期): 2020-10-30.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201030.1638.002.html>

绿豆 [*Vigna radiate* (L.) Wilczek] 属于豆科 (Leguminosae)、蝶形花亚科 (Papilionaceae)、豇豆属 (*Vigna*), 是严格的闭花授粉双子叶作物。作为全球 (尤其是亚洲) 农业系统中的重要杂粮作物^[1-2], 绿豆是优质膳食蛋白质、维生素、矿物质和碳水化合物的来源^[3-4]。近些年随着我国种植结构调整和农业供给侧结构改革的进行, 绿豆的需求量持续攀升, 但其产量一直相对较低^[5]。杂交是提高作物产量的有效手段, 且杂交种具有适应性强、均匀性好、非生物和生物耐受性高等优良性状, 为农业增产做出了巨大贡献^[6-8]。玉米是世界上首个利用杂种优势实现商业化杂交种的作物^[9-10], 随后在水稻^[6]、小麦^[11]、大麦^[12]、油菜^[13]、棉花^[14]等多个作物中逐渐建立了杂交育种体系。研究显示, 绿豆杂种优势突出, 利用绿豆品种‘KPS1’与‘Korea 7’等不同组合配制的杂交种在产量上最高可得到 40% 以上的超亲优势^[15]。但由于绿豆是严格的闭花授粉作物, 严重阻碍了其杂种优势利用。

在雌雄同花作物中, 雄性不育材料是杂种利用中的宝贵资源。广义上讲, 雄性不育是指植物不能产生开裂的花药、有功能的花粉或有活力的雄配子^[16], 可分为 3 种类型: (1) 细胞质不育 (cytoplasmic male sterility, CMS), 由核基因偶联的线粒体基因引起, 又叫核质互作不育^[17], 可应用于“三系法”杂交体系, 但需要可靠的恢复系^[18]。(2) 细胞核不育 (genetic male sterility, GMS), 仅由核基因引起^[19], 先前由于较难获得大规模雄性不育母本而在杂交制种中难以应用, 但随着生物技术的发展以及不断的科学探索, 科学家已在玉米等异花传粉作物中开发出基于隐性核雄性不育的高效制种系统^[20-21];(3) 环境敏感型核不育 (environment-sensitive genic male sterility, EGMS), 指育性受到光周期、温度等环境因素影响^[7], 可应用于“两系法”杂交体系。在拟南芥、水稻、玉米等植物中雄性不育材料的研究报道很多且类型多样, 花粉的细胞学分析及其败育的分子机理也研究得较为透彻^[21-24]。

然而, 目前绿豆的雄性不育研究尚属空白。本研究通过对‘苏绿 1 号’进行 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 诱变获得绿豆稳定遗传雄性不育突变体, 分析了其表型, 对育性分离群体进行了遗传分析, 以及对其花粉发育进行了细胞学分析, 解析了花粉败育发生的时期和可能的原因, 以期为深入研究绿豆雄性不育机理及杂种优势利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

田间试验于 2014—2019 年在江苏省农业科学院试验基地进行, 室内试验在江苏省农业科学院经济作物研究所内实验平台完成。

1.2 ‘苏绿 1 号’辐射诱变

2014 年初对 3 kg ‘苏绿 1 号’ (约 5 万粒) 进行 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射诱变, 使用剂量 200 Gray。诱变后的绿豆种子播种, M_1 代混收。从 M_2 代诱变群体中选择 1000 个单株种成株行。从其后代 (M_3) 中筛选育性相关突变体。

1.3 绿豆雄性不育突变体的表型分析

‘苏绿 1 号’和 *msm2015-1* 突变体于谷雨时节盆栽种植于江苏南京市江苏省农业科学院院内, 分析观察了连续 2 年的表型, 包括营养生长期的株型和株高、花期的花蕾和盛开花朵的结构, 以及成熟期结荚情况, 2 年表现型一致。成熟花粉的花药和柱头表型于体视镜下观察。扫描电镜方法参考文献^[25], 花组织用 2.5% 戊二醛固定液固定, 观察前用 0.1 mol L^{-1} 磷酸缓冲液冲洗 3 遍, 之后使用梯度酒精溶液脱水, 酒精-异戊基醋酸 ($v/v = 1/3$) 溶液中处理 1 h, CO_2 临界点干燥, 真空镀膜, 使用江苏省农业科学院中心实验室平台蔡司扫描电子显微镜 (EVO-LS10) 进行观察。

1.4 绿豆雄性不育突变体群体的遗传学分析

单株收获与不育株同一个株系的可育植株, 按株系种植 M_4 代。去除表型不分离的株系 (全部可育) 后, 将可分离的株系组成遗传群体进行遗传学分析。统计了分离群体中可育株系和不育株系的数目, 利用卡方进行符合性检测。

1.5 绿豆雄性不育突变体的细胞学观察

绿豆盛花期, 于上午 8:00 左右, 收集‘苏绿 1 号’和 *msm2015-1* 突变体不同发育时期的花苞及盛开的花朵, 置于卡诺固定液 (无水乙醇: 冰醋酸 = 3: 1) 或者 FAA 固定液 (50% 乙醇: 冰醋酸: 甲醛 = 89: 6: 5) 中固定备用。

1.5.1 成熟花粉粒生活力检测 此部分试验方法主要参考文献^[25-26]。(1) 花粉柱头萌发: 盛开的绿豆花朵置于卡诺固定液中固定 24 h 后, 雌蕊经酒精系列复水, 再用蒸馏水漂洗 3 次。置于 2 mol L^{-1} NaOH 中软化柱头 12 h, 蒸馏水漂洗 3 次, 最后用 0.05% 苯胺蓝避光染色 12 h, 置于荧光倒置显微镜 (蔡司 Axio Vert A1) 下观察并照相, ‘苏绿 1 号’和

msm2015-1 各观察 3 个柱头。(2) 花粉体外萌发: 采用液体培养法, 即在载玻片上滴入适量花粉液体培养基, 在绿豆花朵刚开放时用镊子剖出花粉置于培养基中, 盖上盖玻片, 放入湿润的培养皿中, 30 培养箱中遮光培养 2 h, 光学显微镜下观察, 分别取 3 个‘苏绿 1 号’和 *msm2015-1* 的花粉样本进行试验, 各观察 3 个不同的视野。(3) Alexander 和 I_2 -KI 染色: 固定好的成熟花粉用镊子剖出置于载玻片上, 滴 1~2 滴 Alexander 染液或者 1% I_2 -KI 染液, 盖玻片封片, 光学显微镜下观察。分别取 3 个‘苏绿 1 号’和 *msm2015-1* 的花粉样本进行观察, 每个样本观察 3 个不同的视野, 统计不少于 200 粒花粉, 通过染色率来计算花粉的败育率。

1.5.2 成熟花粉粒核质发育检测 固定好的成熟花粉用镊子剖出置于载玻片上, 在花粉粒上方滴上一滴(10~20 μ L) DAPI 染液, 盖玻片封片, 在黑暗中反应 15 min^[26], 置于荧光倒置显微镜(蔡司 Axio Vert A1)下观察并照相。分别取 3 个‘苏绿 1 号’和 *msm2015-1* 的花粉样本进行染色, 每个样本观察 3 个不同的视野。

1.5.3 花粉母细胞早期发育分析 将不同发育时期的花苞从卡诺固定液中取出, 用杂交镊剥离出花粉置于载玻片上, 滴入适量醋酸洋红染液, 染色 2~5 min, 盖玻片封片, 光学显微镜观察花粉的形态特征, 区分不同的发育时期, 拍照并分析^[25]。‘苏绿 1 号’

和 *msm2015-1* 分别观察 3 组花苞样本。

2 结果与分析

2.1 绿豆雄性不育突变体的获得及表型分析

2015 年 7 月在辐射诱变群体中发现一个绿豆株系出现育性分离, 该株系共有 38 株, 其中 9 株表现为不育, 命名为‘不育绿豆 2015-1’(male sterile *mungbean2015-1*, 简称为 *msm2015-1*)。表型分析发现, 营养生长期 *msm2015-1* 的株高和株型与‘苏绿 1 号’没有明显差异(图 1-A)。盛花期, *msm2015-1* 花器官外观形态发育正常, 花蕾、盛开的花朵及其旗瓣、翼瓣、龙骨瓣形态均正常(图 1-B~D)。成熟期‘苏绿 1 号’叶片发黄脱落且有大量结实荚, 而 *msm2015-1* 生长势依旧旺盛, 叶片肥厚呈绿色不脱落, 不能正常结荚, 偶有小肉荚, 但在开花 2~3 d 后自然脱落(图 1-E, F)。若土壤肥力充足, *msm2015-1* 可无限持续开花数月。

花药解剖结构分析发现, ‘苏绿 1 号’花药饱满正常开裂(图 2-A, D), 有大量黄色花粉散出并附着于柱头(图 2-B), 而 *msm2015-1* 花药发白, 没有正常开裂散粉(图 2-A, E), 柱头上几乎没有花粉附着(图 2-C)。扫描电镜观察发现, 正常的成熟花粉粒呈饱满的近球形, 表面呈多个规则的多边形排列, 萌发孔可见(图 2-F), 而 *msm2015-1* 的花粉粒大多皱缩呈扁帽子状, 且花粉粒大小不一, 表明纹路杂乱不规则, 未观察到正常的萌发孔(图 2-G)。

图 1 绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1* 表型分析

Fig. 1 Phenotypic analysis of the *msm2015-1* mutant in mungbean

A: 营养生长期; B: 花蕾; C: 盛开的花朵; D: 花蕾解剖图, 从左至右依次为旗瓣、翼瓣、龙骨瓣、雄蕊和雌蕊; E: 开花后第 2 天的豆荚; F: 近成熟的豆荚。A 图中标尺为 10 cm, B~F 图中标尺为 1 cm。

A: vegetative growth stage; B: flower buds; C: opening flowers; D: anatomy of the flower bud, from left to right in order: standard petals, wing petals, keel petals, stamens and pistils; E: the little pods on 2nd day after flowering; F: nearly ripen pods. In figure A, bar = 10 cm; in figure B to F, bar = 1 cm.

图 2 绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1* 花药及花粉粒形态观察

Fig. 2 Morphology observation of *msm2015-1*'s anthers and pollen grains in mungbean

A: 花药, 白色箭头指示 *msm2015-1* 未正常开裂; B: ‘苏绿 1 号’柱头, 白色箭头指示大量花粉附着; C: *msm2015-1* 柱头, 白色箭头指示几乎无花粉附着; D: ‘苏绿 1 号’花药的扫描电镜图; E: *msm2015-1* 花药的扫描电镜图; F: ‘苏绿 1 号’成熟花粉粒的扫描电镜图; G: *msm2015-1* 成熟花粉粒的扫描电镜图。A~C 图中标尺为 1 mm, D 和 E 图中标尺为 100 μm, F 和 G 图中标尺为 10 μm。

A: stamen, the white arrows indicate the indehiscent anther of *msm2015-1*; B: the pistil of Sulyu 1, the white arrow indicates the attached pollen grains on stigma; C: the pistil of *msm2015-1*, the white arrow indicates rarely pollen grains attached on stigma; D: scanning electron micrograph (SEM) image of Sulyu 1's anther; E: SEM image of *msm2015-1*'s anther; F: SEM image of Sulyu 1's mature pollen grains; G: SEM image of *msm2015-1*'s mature pollen grains. In figure A to C, bars = 1 mm; in figure D and E, bars = 100 μm; in figure F and G, bars = 10 μm.

2.2 育性分离群体的遗传学分析

msm2015-1 所在的育性分离群体(M_3 代)共有 38 株, 其中 29 株可育, 9 株不育; 由这 29 个可育株衍生的 $M_{3,4}$ 株系中有 16 个株系发生分离, 在 M_4 代统计了这些分离株系的分离比, 可育株系 187 株, 不育株系共有 71 株, $\chi^2_{3:1}$ 等于 0.873, 小于 $P_{0.05}=3.84$ (表 1), 表明 *msm2015-1* 雄性不育性状由单个隐性核基因控制。

2.3 花粉发育的细胞学分析

2.3.1 成熟花粉生活力的检测 本研究首先用苯胺蓝染色观察花粉柱头萌发情况发现, ‘苏绿 1 号’柱头上附着的花粉粒及其萌发出的花粉管清晰可见 (图 3-A), 而 *msm2015-1* 中柱头上几乎看不到花粉粒 (图 3-B), 与图 2-C 结果一致。为了检测 *msm2015-1* 的花粉是否具有萌发活力, 我们用杂交镊剖开成熟花药, 挤出花粉粒进行体外萌发试验发现, ‘苏绿 1

表 1 育性分离群体的遗传学分析

Table 1 Genetic analysis of fertility separation population

表型 Phenotype	观察值 Observed number	理论值 Theoretical number	χ^2 (3:1)
可育株 Fertile plants	187	193.5	0.873
不育株 Sterile plants	71	64.5	

号'的花粉粒在体外萌发正常,而 *msm2015-1* 花粉粒的离体萌发率几乎为 0 (图 3-C, D)。Alexander 染色结果显示,野生型花粉可以均匀正常着色(图 4-A),而 *msm2015-1* 花粉大多不能着色(图 4-B);统计数据显示, *msm2015-1* 花粉败育率为 96.67% (图 4-C)。I₂-KI 染色结果发现,野生型花粉形状规则,可以被均匀染色(图 4-D),而 *msm2015-1* 花粉染色异常(图 4-E),出现了典败、圆败和染败 3 种类型,其中典败和圆败居多,表明突变体花粉败育时期较早;统计数据显示, *msm2015-1* 花粉败育率为 94.50% (图 4-F)。同时,我们用 Alexander 染色分析成熟花蕾的花药发现,‘苏绿 1 号’花药囊里的花粉粒可以被染成紫红色,形状规则饱满(图 4-G);而 *msm2015-1* 花药囊形状干瘪,内部花粉粒着色异常(图 4-H)。

2.3.2 成熟花粉细胞核发育的检测 绿豆的成熟花粉粒属于 2-细胞型,即当花粉从裂开花药中散出时,雄配子仍在 2-细胞的发育阶段,含有 1 个生殖核和 1 个营养核^[27]。DAPI 染色结果显示,在‘苏绿 1 号’的成熟花粉粒中可以检测到 2 个核,紧凑且亮度高的为生殖核,较为松散的为营养核(图 5-A),花粉粒性状规则。而在 *msm2015-1* 的成熟花粉粒中未观察到明显的

细胞核,且花粉粒大小不一(图 5-B),核质发育异常。

图 3 绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1* 花粉体内及体外萌发
Fig. 3 Pollen germination of the *msm2015-1* mutant *in vivo* and *in vitro* in mungbean

A: ‘苏绿 1 号’花粉柱头萌发,白色箭头指示柱头上花粉粒及其萌发出的花粉管; B: *msm2015-1* 花粉柱头萌发,白色箭头指示柱头上无花粉粒附着; C: ‘苏绿 1 号’成熟花粉体外萌发; D: *msm2015-1* 成熟花粉体外萌发。图中标尺为 100 μm。
A: pollen germination on stigma of Sulyu 1, the white arrows indicate the pollen grains attached on stigma and germinated pollen tubes; B: pollen germination on stigma of *msm2015-1*, the white arrow indicates few pollen grains attached on stigma; C: mature pollen germination of Sulyu 1 *in vitro*; D: mature pollen germination of *msm2015-1* *in vitro*. Bar = 100 μm.

图 4 绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1* 花粉活力的染色分析

Fig. 4 Pollen viability of the *msm2015-1* mutant analyzed by staining analysis in mungbean

A: ‘苏绿 1 号’成熟花粉的 Alexander 染色; B: *msm2015-1* 成熟花粉的 Alexander 染色; C: Alexander 染色花粉败育率统计; D: ‘苏绿 1 号’成熟花粉的 I₂-KI 染色; E: *msm2015-1* 成熟花粉的 I₂-KI 染色; F: I₂-KI 染色花粉败育率统计; G: ‘苏绿 1 号’成熟花蕾的花药 Alexander 染色; H: *msm2015-1* 成熟花蕾的花药 Alexander 染色。图中标尺为 100 μm。

A: Alexander staining of Sulyu 1's mature pollen; B: Alexander staining of *msm2015-1*'s mature pollen; C: statistics of pollen abortion rate of Alexander staining; D: I₂-KI staining of Sulyu 1's mature pollen; E: I₂-KI staining of *msm2015-1*'s mature pollen; F: statistics of pollen abortion rate of I₂-KI staining; G: Alexander staining of Sulyu 1's anthers of mature flower bud; H: Alexander staining of *msm2015-1*'s anthers of mature flower bud. Bar = 100 μm.

图 5 绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1* 的花粉细胞核发育检测
Fig. 5 Detection of pollen nuclear development in the *msm2015-1* mutant

A: ‘苏绿 1 号’成熟花粉 DAPI 染色, 白色和红色箭头分别指示生殖核和营养核; B: *msm2015-1* 成熟花粉 DAPI 染色。图中标尺为 20 μm。
A: DAPI staining of Sulyu 1's mature pollen, the white arrow indicates the generative nucleus, and the red arrow indicates the vegetative nucleus; B: DAPI staining of *msm2015-1*'s mature pollen. Bar = 20 μm.

2.3.3 花粉早期发育阶段细胞学观察 花粉碘染试验表明, *msm2015-1* 败育发生在花粉发育早期, 为确定具体的败育时期, 我们分别对不同发育时期的花蕾进行醋酸洋红染色发现, *msm2015-1* 的花粉在四分体时期出现了异常, 正常花粉粒会经减数分裂

分成 4 个大小均等的小孢子, 而 *msm2015-1* 的花粉母细胞则出现了不均匀分裂和异常多分裂现象 (图 6-A), 其中异常多分裂较为常见, 可以观察到多种类型的分裂现象 (图 6-B), 最终导致花粉败育。表明四分体时期花粉母细胞的减数分裂异常是导致 *msm2015-1* 花粉败育的主要原因。

3 讨论

3.1 绿豆雄性不育突变体与杂种优势利用

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射诱变是常用的育种手段, 可加快农作物新品种的选育进程。本研究利用该方法成功获得绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1*, 花药不能正常散粉且花粉败育, 座荚率几乎为 0。在田间试验中, 本研究发现, *msm2015-1* 有极少量的自结荚, 暗示雌配子可能是可育或者部分可育的, 不育株的后代可以稳定遗传雄性不育表型。自结荚可能是由于 *msm2015-1* 花粉未彻底败育, 抑或花粉母细胞减数分裂时会偶尔产生极少量的正常花粉, 由虫媒辅助授粉所致。

图 6 绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1* 花粉早期发育阶段分析

Fig. 6 Developmental early stage analysis of *msm2015-1*'s pollen in mungbean

A: 花粉早期发育的各个时期, 白色箭头指示 *msm2015-1* 四分体时期的不对称和不均等分裂导致形成的大小不一的小孢子; B: 四分体时期出现的异常多分裂, 图中数字表示 *msm2015-1* 分裂出的小孢子个数。PMC: 花粉母细胞; Tetrads: 四分体; Msp: 小孢子; Pollen: 花粉。图中标尺为 20 μm。

A: the early stages of pollen development, the white arrows indicate the uneven-size microspores caused by the asymmetry and inhomogeneity meiosis during the tetrad stage; B: the anomalous more fission of meiosis happened during the tetrad stage, the numbers of *msm2015-1*'s microspores are indicated by the Arabic numbers. PMC: pollen mother cell; Msp: microspore. Bar = 20 μm.

豆科作物的杂种优势明显,但受其花器官结构、易落花落英、授粉方式等因素影响,制种难度大,杂种优势利用研究也相对落后^[28]。木豆是目前世界上唯一商业化杂交制种的豆科植物。1991 年,印度国际半干旱热带作物研究所(ICRISAT)利用隐性细胞核不育系(GMS)育成并发布了首个木豆杂交种 ICPH8,与主栽品种对照增产超 25.6%以上^[29]。随后 ICRISAT 的科学家育成了基于细胞质不育系(CMS)的首个商业化杂交木豆 ICPH 2671,增产高达 47%^[30]。大豆杂交种研究已持续了数十年,21 世纪初期,吉林省农业科学院育成并审定了世界上第一批杂交大豆,由基于 CMS 的“三系法”杂交获得,产量提高 20%以上,同时研究建立了“环境 昆虫 作物三位一体综合调控”制种体系^[31-32]。然而,大豆杂交制种仍然存在技术瓶颈,因而至今尚未大面积商业化推广。其他豆类作物如菜豆,其杂交种可增产高达 47%,虽已经发现了 CMS 突变体,但同样限于杂交制种阻碍未能商业化推广^[17]。

绿豆是严格的自花授粉作物,天然异交率约 1.68%^[33],严重制约着其杂交制种。因此,绿豆杂种优势利用也将会遇到一些技术瓶颈,只有通过优异资源的不断挖掘和现代生物技术的融入才能有效推动其发展。本研究组前期发现的绿豆花开张突变体(chasmogamous mutant, CM)翼瓣和龙骨瓣缺失,花药外露,打破了绿豆进行异花传粉的生理障碍,可开发为较为理想的父本材料,迈出了绿豆杂交制种的第一步^[34]。因此当下选育可利用的绿豆雄性不育系是实现绿豆杂交制种的关键锁钥。绿豆雄性不育研究相对粮食作物(如水稻、小麦等)和大宗经济作物(如玉米、棉花、大豆等)落后很多,目前尚无相关报道。本研究通过辐射诱变育种技术首次获得了绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1*。遗传分析发现,育性分离群体的可育株和不育株的分离比符合 3:1,表明不育性状由单个隐性核基因控制。目前,我们正在试验优化杂交组合构建定位群体,以开展后续的基因定位和功能研究工作。

3.2 绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1* 花粉败育的原因剖析

植物雄性生殖涉及多个发育过程,包括雄蕊分生组织的特化、造孢细胞的形成及小孢子母细胞的分化、减数分裂、小孢子的成熟和授粉^[35]。雄性不育可由孢子体或配子体花药组织的异常发育所致。大多数孢子体雄性不育突变体主要影响

绒毡层和减数分裂细胞,导致花粉败育或无花粉不育;而配子体雄性不育突变体主要影响小孢子或花粉粒的发育^[16]。

msm2015-1 的花药不能正常开裂散出花粉(图 2),花粉柱头染色亦未见花粉附着和花粉管伸长(图 3),表明花粉几乎不能与柱头接触授粉。花药开裂是植物完成授粉的重要步骤之一,包括药室内壁的增厚、绒毡层的降解和裂口的形成 3 个过程,其受到包括激素(如 IAA、JA、GA 等)和环境因素(如低温等)在内的复杂信号通路的调控^[36-37]。很多雄性不育突变体是由于绒毡层细胞的异常分化和降解所致。研究发现,参与绒毡层的发育调控的基因主要有 bHLH 转录因子、MYB 转录因子、PHD-finger 结构域蛋白等^[38-39]。例如拟南芥 *DYTI* (*DYSFUNCTIONAL TAPETUM1*)和 *AMS* (*ABORTED MICROSPORES*),水稻中对应同源基因 *UDTI* (*UNDEVELOPED TAPETUM1*)和 *TDR* (*TAPETUM DEGENERATION RETARDATION*)等都属于 bHLH 转录因子^[38,40];拟南芥 *MYB33*、*MYB65*、*TDF1* (*DEFECTIVE in TAPETAL DEVELOPMENT and FUNCTION1*)和 *AtMYB103/MS188* 以及水稻 *GAMYB* 等都属于 MYB 转录因子^[39,41];拟南芥 *MSI* (*MALE STERILITY1*)、水稻 *PTC1* (*PERSISTENT TAPETAL CELL1*)等编码了 PHD-finger 结构域蛋白^[38,42]。*msm2015-1* 的花药开裂异常是否与绒毡层的发育相关需要进一步的研究验证。

从 *msm2015-1* 成熟花药中挤出的花粉粒在体外未萌发,细胞质不能被 Alexander 和 I₂-KI 染液正常着色(图 4),表明花粉几乎无生活力。碘染中圆败居多,表明花粉败育时期发生在花粉发育早期阶段。DAPI 染色实验中,在 *msm2015-1* 成熟花粉中未观察到细胞核(图 5),这可能是由于早期花粉母细胞减数分裂异常,或者单核花粉细胞有丝分裂异常引起。我们通过对不同发育时期的花粉进行分析发现,*msm2015-1* 的花粉母细胞出现了减数分裂异常,四分体时期出现不均匀分裂及异常多分裂现象(图 6),导致产生了没有活力、大小不均一的小孢子。花粉母细胞减数分裂异常也是影响育性的常见原因,在水稻、拟南芥等植物中发现的相关突变体很多,可发生在减数分裂的各个时期,尤其是减数分裂 I 前期的同源染色体配对和联会、后期的同源染色体分离和胞质分裂等。水稻中报道的与 *PAIR* (pairing aberration in rice)相关的雄性不育突变体,如 *pair3*

在同源染色体配对联会时发生异常, 最终导致了雌雄配子均败育^[43]。油菜代表性温敏不育系(TGMS) TE5A 株系, 也是同源染色体无法正常配对联会及形成二价体, 最终导致无花粉粒败育^[44]。拟南芥 *ems1* (excess microsporocytes1) 突变体虽然在减数分裂时核分裂是正常的, 但小孢子母细胞不进行胞质分裂, 导致小孢子未形成及最终的雄性不育^[45]。水稻中 *DTM1* (*DEFECTIVE TAPETUM AND MEIOCYTES 1*) 编码一类谷物中特异的内质网蛋白, 同时调控着花粉绒毡层的分化和降解及减数分裂, 表现为在减数分裂 I 早期停滞, 最终无花粉粒生成而败育^[46]。水稻 *osagg1* 突变体表现出花药不开裂, 花粉粒大多数干瘪且典败型, 与 *msm2015-1* 的表型较为相似, 研究发现, *osagg1* 减数分裂早期重组和联会发生正常, 但重组交叉数明显减少, 最终导致了雌雄配子均败育^[47]。然而, *msm2015-1* 的花粉减数分裂异常具体发生在哪个阶段以及雌配子育性是否受到影响还有待进一步的研究验证。由于 *msm2015-1* 的花药不开裂, 且减数分裂异常, 推断其应属于孢子体雄性不育突变体, 败育的分子机制有待进一步的深入研究。

4 结论

本研究通过 ⁶⁰Co- γ 辐射诱变成功获得绿豆雄性不育突变体 *msm2015-1*, 营养生长表型正常, 座荚率几乎为 0, 不育表型可稳定遗传。遗传分析显示, 可育和不育株系的分离比符合 3:1, 表明不育性状由单个隐性核基因控制。*msm2015-1* 的花药开裂异常, 花粉几乎无生活力, 细胞核发育异常, 花粉败育发生在四分体时期, 由花粉母细胞减数分裂不均匀和异常多分裂所致, 属于核基因控制的孢子体雄性不育类型。

References

- [1] Rabbi S M F, Rahman M M, Mondal M M A, Bhowal S K, Haque M A. Effect of chitosan application on plant characters, yield attributes and yield of mungbean. *Res J Agric Environ Manage*, 2016, 5: 95–100.
- [2] Lambrides C J, Godwin I D. Mungbean. *Genome Map Mol Breed Plants*, 2007, 3: 69–90.
- [3] Kang Y J, Kim S K, Kim M Y, Lestari P, Kim K H, Ha B K, Jun T H, Hwang W J, Lee T, Lee J, Shim S, Yoon M Y, Jang Y E, Han K S, Taeprayoon P, Yoon N, Somta P, Tanya P, Kim K S, Gwag J G, Moon J K, Lee Y H, Park B S, Bombarely A, Doyle J J, Jackson S A, Schafleitner R, Srinives P, Varshney R K, Lee S H. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species. *Nat Commun*, 2014, 5: 5543.
- [4] Singh N, Mallick J, Sagolsem D, Mandal N, Bhattacharyya S. Mapping of molecular markers linked with MYMIV and yield attributing traits in mungbean. *Indian J Genet Plant Breed*, 2018, 78: 118–126.
- [5] 邢宝龙, 殷丽丽. 绿豆育种及分子遗传学研究进展. 现代农业科技, 2017, (10): 39–40.
Xing B L, Yin L L. Research progress of breeding and molecular genetics on *Vigna radiata* L. *Modern Agric Sci Technol*, 2017, (10): 39–40 (in Chinese with English abstract).
- [6] Tester M, Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 2010, 327: 818–822.
- [7] Kim Y J, Zhang D B. Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding. *Trends Plant Sci*, 2018, 23: 53–65.
- [8] Longin C F H, Muhleisen J, Maurer H P, Zhang H L, Gowda M, Reif J C. Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 1087–1096.
- [9] Duvick D N. Biotechnology in the 1930s: the development of hybrid maize. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 69–74.
- [10] Li G, Dong Y, Zhao Y, Tian X, Liu W. Genome-wide prediction in a hybrid maize population adapted to northwest China. *Crop J*, 2020, 8: 830–842.
- [11] Li H L, Zhou Y, Xin W L, Wei Y Q, Zhang J L, Guo L L. Wheat breeding in northern China: achievements and technical advances. *Crop J*, 2019, 7: 718–729.
- [12] Muhleisen J, Maurer H P, Stiewe G, Bury P, Reif J C. Hybrid breeding in barley. *Crop Sci*, 2013, 53: 819–824.
- [13] Luo X, Tan Y Q, Ma C Z, Tu J X, Shen J X, Yi B, Fu T D. High-throughput identification of SNPs reveals extensive heterosis with intra-group hybridization and genetic characteristics in a large rapeseed (*Brassica napus* L.) panel. *Euphytica*, 2019, 215: 2–10.
- [14] Tang G L, Quan Y W, Mi H F, Zhai L X, Li J J, Li W L. Breeding of high yield, high quality and disease-resistant hybrid cotton varieties Hanza 160 and Hanza 1692. *Agric Biotechnol*, 2018, 7: 37–39.
- [15] Chen X, Sorajjapinun W, Reiwthongchum S, Srinives P. Identification of parental mungbean lines for production of hybrid varieties. *CMU J*, 2003, 2: 97–106.
- [16] Chen L T, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 579–606.
- [17] Bohra A, Jha U C, Adhimoolam P, Bisht D, Singh N P. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 967–993.
- [18] Van Ginkel M, Ortiz R. Cross the best with the best, and select the best: HELP in breeding selfing crops. *Crop Sci*, 2018, 58: 17–30.
- [19] Li J J, Nadeem M, Sun G L, Wang X B, Qiu L J. Male sterility in soybean: Occurrence, molecular basis and utilization. *Plant Breed*, 2019, 138: 659–676.
- [20] Wu Y, Fox T W, Trimmell M R, Wang L, Xu R J, Cigan A M, Huffman G A, Garnaat C W, Hershey H, Albertsen M C. Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 1046–1054.
- [21] Wan X Y, Wu S W, Li Z W, Dong Z Y, An X L, Ma B, Tian Y H, Li J P. Maize genic male-sterility genes and their applications in hybrid breeding: progress and perspectives. *Mol Plant*, 2019, 12:

- 321–342.
- [22] Kim Y J, Zhang D, Jung K H. Molecular basis of pollen germination in cereals. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 1126–1136.
- [23] Zhang D, Luo X, Zhu L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development. *J Genet Genomics*, 2011, 38: 379–390.
- [24] Shi J X, Cui M H, Yang L, Kim Y J, Zhang D B. Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 741–753.
- [25] 陈海元. 水稻种间杂种不育位点 S40 的精细定位及其败育机理的研究. 南京农业大学博士学位论文, 江苏南京, 2017.
Chen H Y. Fine Mapping and Study of Sterility Mechanism of the Interspecific Hybrid Sterility Locus S40 in Rice. PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [26] Li H M, Chen H, Yang Z N, Gong J M. *Cdi* gene is required for pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 2012, 586: 1027–1031.
- [27] 蒋祥新. 绿豆大小孢子发生与雌雄配子体发育. 湖北农学院学报, 1989, (1): 52–59.
Jiang X X. Mega- and microsporogenesis and development of male and female gametophytes in mungbean. *J Hubei Agric Coll*, 1989, (1): 52–59 (in Chinese with English abstract).
- [28] 孙襄, 张井勇, 王玉民, 赵丽梅. 木豆、苜蓿和大豆 3 种豆科作物杂种优势利用概述. 中国农业科学, 2009, 42: 1528–1539.
Sun H, Zhang J Y, Wang Y M, Zhao L M. A review of utilization of heterosis in three legume crops of pigeonpea, alfalfa and soybean. *Sci Agric Sin*, 2009, 42: 1528–1539 (in Chinese with English abstract).
- [29] Saxena K B, Chauhan Y S, Laxman S, Kumar R V, Johansen C. Research and development of hybrid pigeonpea. *Res Bull*, 1996, 19.
- [30] Saxena K B, Kumar R V, Tikle A N, Saxena M K, Gupta P. ICPH 2671: the world's first commercial food legume hybrid. *Plant Breed*, 2013, 132: 479–485.
- [31] 赵丽梅, 孙襄, 王曙明, 王跃强, 黄梅, 李建平. 大豆杂交种杂交豆 1 号选育报告. 中国油料作物学报, 2004, 26: 16–18.
Zhao L M, Sun H, Wang S M, Wang Y Q, Huang M, Li J P. Breeding report of hybrid soybean 'Hybrid Bean No. 1'. *Chin J Oil Crop Sci*, 2004, 26: 16–18 (in Chinese with English abstract).
- [32] 赵丽梅, 彭宝, 张伟龙, 张连发, 张井勇, 李建平, 李茂海, 孙襄. 杂交大豆制种技术体系的建立. 大豆科学, 2010, 29(4): 165–169.
Zhao L M, Peng B, Zhang W L, Zhang L F, Zhang J Y, Li J P, Li M H, Sun H. Establishment of technology system for hybrid soybean seed production. *Soybean Sci*, 2010, 29(4): 165–169 (in Chinese with English abstract).
- [33] Sangiri C, Kaga A, Tomooka N, Vaughan D, Srinives P. Genetic diversity of the mungbean (*Vigna radiata*, Leguminosae) gene-pool on the basis of microsatellite analysis. *Aust J Bot*, 2007, 55: 837–847.
- [34] Chen J, Somta P, Chen X, Cui X, Yuan X, Srinives P. Gene mapping of a mutant mungbean (*Vigna radiata* L.) using new molecular markers suggests a gene encoding a YUC4-like protein regulates the chasmogamous flower trait. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 830.
- [35] Guo J X, Liu Y G. Molecular control of male reproductive development and pollen fertility in rice. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54: 967–978.
- [36] Xiao Y, You S, Kong W, Tang Q, Bai W, Cai Y, Zheng H, Wang C, Jiang L, Wang C. A GARP transcription factor *anther dehiscence defected 1* (*OsADD1*) regulates rice anther dehiscence. *Plant Mol Biol*, 2011, 101: 403–414.
- [37] Song S, Chen Y, Liu L, Benjamin S Y H, Mao C, Gan Y, Yu H. *OsFTIP7* determines auxin-mediated anther dehiscence in rice. *Nat Plants*, 2018, 4: 495–504.
- [38] Zhu J, Lou Y, Xu X F, Yang Z N. A genetic pathway for tapetum development and function in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53: 892–900.
- [39] Li D D, Xue J S, Zhu J, Yang Z N. Gene regulatory network for tapetum development in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1559.
- [40] Ranjan R, Khurana R, Malik N, Badoni S, Parida S K, Kapoor S, Tyagi A K. *bHLH142* regulates various metabolic pathway-related genes to affect pollen development and anther dehiscence in rice. *Sci Rep*, 2017, 7: 43397.
- [41] Yu J, Meng Z, Liang W, Kudla J, Tucker M R, Luo Z, Chen M, Xu D, Zhao G, Wang J. A rice Ca^{2+} binding protein is required for tapetum function and pollen formation. *Plant Physiol*, 2016, 172: 1772–1786.
- [42] Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, Yang C, Liang W, Zong J, Wilson Z A, Zhang D. *PERSISTENT TAPETAL CELL1* encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice. *Plant Physiol*, 2011, 156: 615–630.
- [43] Yuan W, Li X, Chang Y, Wen R, Chen G, Zhang Q, Wu C. Mutation of the rice gene *PAIR3* results in lack of bivalent formation in meiosis. *Plant J*, 2009, 59: 303–315.
- [44] Yan X, Zeng X, Wang S, Li K, Yuan R, Gao H, Luo J, Liu F, Wu Y, Li Y, Zhu L, Wu G. Aberrant meiotic prophase I leads to genic male sterility in the novel *TE5A* mutant of *Brassica napus*. *Sci Rep*, 2016, 6: 33955.
- [45] Zhao D Z. The *EXCESS MICROSPOROCTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev*, 2002, 16: 2021–2031.
- [46] Yi J, Kim S R, Lee D Y, Moon S, Lee Y S, Jung K H, Hwang I, An G. The rice gene *DEFECTIVE TAPETUM AND MEIOCYTES 1* (*DTM1*) is required for early tapetum development and meiosis. *Plant J*, 2012, 70: 256–270.
- [47] Chang Z, Xu C, Huang X, Yan W, Qiu S, Yuan S, Ni H, Chen S, Xie G, Chen Z, Wu J, Tang X. The plant-specific *ABERRANT GAMETOGENESIS 1* gene is essential for meiosis in rice. *J Exp Bot*, 2020, 71: 204–218.