苎麻雄性不育的细胞学和生理学初步研究

摘　　要

苎麻 (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) 属于荨麻科 (Urticaceae) 苎麻属 (*Boehmeria*) 宿根性作物。苎麻起源于中国，西方人誉称为“中国草”。苎麻是一种优良的纺织工业原料和主要出口产品，在国民经济中占重要地位。麻雄性不育杂种优势已经应用于生产，但对其基础生物学问题研究甚少。本研究采用苎麻雄性不育系 SS370、GS14-1 及其对应保持系 GS13-X_1、GS13-X_2 为材料，观察小孢子发育的细胞学特征，比较分析生理指标差异，为苎麻雄性不育的基础理论研究积累资料。主要研究结果如下：

1. 通过常规石蜡切片观察，发现两个保持系 GS13-X_1 和 GS13-X_2 的雄蕊和小孢子发育特征相同，但其对应不育系 SS370 和 GS14-1 的雄性败育特征却略有差异：SS370 的雄性败育发生更早，败育更彻底，在雄花花序分化期便出现败育。GS14-1 的雄性败育发生稍晚，多在雄花被形成后雌雄蕊原基分化期发生败育；雌雄蕊原基分化出现异常，有的出现雄蕊原基退化，有的出现雄蕊原基畸形。

2. 在花蕾生长发育期间，不育系叶片中丙二醛含量比保持系更高。SS370 叶片的脯氨酸含量在各个时期中都低于对应的保持系；GS14-1 在营养生长期和现蕾初期的脯氨酸含量比对应保持系略高，但之后不育系脯氨酸含量均低于保持系。

3. SOD 活性和 CAT 活性在 2 组材料中表现为一致性的规律：2 个苎麻雄性不育系叶片中的 SOD 活性都比对应保持系的高，2 个不育系 CAT 活性都比对应保持系的低。但 POD 活性表现不太一致：SS370 比其保持系 GS13-X_1 更低，而 GS14-1 比其保持系 GS13-X_2 更高。

4. 2 个雄性不育系的蛋白质含量在各时期都比其对应保持系更低，而且随着花蕾的发育，这种差距还有扩大的趋势。

上述研究结果表明，2 个苎麻不育系雄性败育的细胞学特征各有差异，丙二醛和脯氨酸含量、抗氧化酶如 SOD、POD 和 CAT 的活性，以及蛋白质代谢的变化，可能影响苎麻不育系雄性器官的发育，最终导致雄性不育。

关键词：苎麻；雄性不育；细胞学；生理学；脯氨酸；SOD；POD；CAT

Preliminary study on Cytology and Physiology of Male Sterility in Ramie

Abstract

Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.), a perennial fiber crop in genus *Boehmeria*, family Urticaceae, originated in China, and is called as "China grass". Ramie is one of the excellent fabric raw materials and leading export products, playing an important role Chinese economy. Ramie heterosis has been utilized in production, but the knowledge on biology of ramie heterosis is poorly documented. In this paper, cytoplasmic male sterile (CMS) line SS370 and GS14-1 and their corresponding maintainer lines GS13-X_1 and GS13-X_2 were used for observing the developmental characteristics of microspores and the differences in physiological index. This work might offer some useful information for understanding of the basic rules in ramie CMS. The main results were as follows.

1. The developmental characteristics of stamens and microspores in the two maintainer lines (GS13-X_1 and GS13-X_2) were observed by means of normal paraffin method. The sterile characteristics of their corresponding CMS lines (SS370 and GS14-1) were slightly different. The abortion stage of SS370 was complete and earlier than that of GS14-1. Male abortion could occur at the stage of anthotaxy differentiation in SS370, but in GS14-1 that occurred at the stage of differentiation of stamen and pistil primordia, after perianth formation. The differentiation of stamen and pistil primordia showed abnormality, e.g. degeneration or/and malformation of stamen primordium.

2. The malondiadehyde (MDA) contents in leaves of CMS lines at the stage of bud development were higher than that in their corresponding maintainer lines. Proline contents of SS370 at all the sampling stages were lower than the corresponding maintainer line. Proline contents of GS14-1 were slightly higher than the corresponding maintainer line at the late vegetative growth stage and the early budding stage, but lower than the corresponding maintainer line thereafter.

3. The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were consistent in the two groups of materials. SOD activities of the two CMS lines were higher than their corresponding maintainer lines. CAT activities of the two CMS lines were lower than their corresponding maintainer lines. But the activity of peroxidase (POD) in CMS line SS370 was lower than maintainer line GS13-X_1, and that of GS14-1 was higher than maintainer line GS13-X_2.

4. The protein content at all sampling stages for the two CMS lines were lower than their corresponding maintainer lines, and the difference increased along with the development stages.

These results showed that the cytological characteristics in two CMS lines were different. The variation of MDA and proline content and the activities of SOD, POD and CAT as well as the protein metabolism might affect the development of the male organs in CMS lines, resulting in CMS.

Key words: ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.); cytoplasmic male sterility; cytology; physiology; proline; superoxide dismutase; peroxidase; catalase

目 录

文摘
英文文摘
声明
第一章植物雄性不育研究概况
1 植物雄性不育概述
1.1 植物雄性不育的概念
1.2 植物雄性不育的表现
1.3 植物雄性不育的分类
2 植物雄性不育研究进展
2.1 植物雄性不育的细胞学研究
2.2 植物雄性不育的生理学研究
2.3 植物雄性不育与环境因素关系的研究
3 苎麻雄性不育的研究进展
4 本研究的目的意义
第二章苎麻雄性不育的细胞学研究
1 材料与方法
1.1 材料
1.2 方法
2 结果与分析
2.1 苎麻雄性不育系雄蕊的败育特征
3 讨论
第三章苎麻雄性不育的生理学研究
1 丙二醛
1.1 材料与方法
1.2 结果与分析
1.3 讨论
2 脯氨酸
2.1 材料与方法
2.2 结果与分析
2.3 讨论
3 细胞膜脂过氧化防御酶
3.1 材料与方法
3.2 结果与分析
3.3 讨论
4 蛋白质
4.1 材料与方法
4.2 结果与分析
4.3 讨论
小结
参考文献

致谢

声　明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得云南大学或其他教育机构的学位或证明而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：杜成　　日　期：2007.6.5

论文使用和授权说明

本人完全了解云南大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅或借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

（保密的论文在解密后应遵循此规定）

研究生签名：杜成　　导师签名：　　日　期：2007.6.5

第一章　植物雄性不育研究概况

1 植物雄性不育性概述

1.1 植物雄性不育的概念

被子植物雄蕊原基分化形成以后，到有功能的成熟花粉粒形成之前这一段时期，要经历一系列形态特征、生理生化等方面的变化，如果这些变化中的任一过程受阻，雄性就不能正常发育，导致不能形成有生活力的花粉，但雌性是可育的，这种现象叫做雄性不育。

1.2 植物雄性不育的表现

植物雄性不育性有多种表现，根据雄性败育发生的早晚，可分为下列几种（刘忠松等，2001）。

（1）雄蕊退化或变形　如果败育发生在雄性器官分化的早期，可使整个雄蕊的发育失败，造成雄蕊严重退化，使其只留痕迹，或雄蕊变成花瓣，或花丝缩短花药弯曲畸形等。

（2）花药异常　雄蕊除花药外形态正常或基本正常，但花药较瘦小干缩，或有非正常色泽而变白或变褐，或花药不正常开裂或不开裂，花药内一般无花粉，少数有败育花粉或少数正常花粉。

（3）孢子囊退化　花药外形接近正常，但由于花药内没有造孢细胞，或孢母细胞减数分裂不正常，或在四分体时期败育，从而使花药内没有花粉或只有极少量花粉。

（4）小孢子退化　一般花药近于正常，花药内有败育花粉。根据花粉败育程度不同，常常又分为三种：①典败，即典型败育型，小孢子在单核期败育，花粉瘦小而皱瘪，形态很不规则。②圆败，小孢子在单核中后期至双核早期发生败育，花粉稍小或大小正常，呈圆形，无淀粉积累，对碘液无蓝色反应。③染败。花粉在双核后期发生败育，花粉内已有淀粉积累，能和碘液发生染色反应。

（5）花粉功能缺陷　花粉形态正常，也能染色，但在正常条件下不能萌发，只在某些特定条件下才可能萌发，形成花粉管。

1.3 植物雄性不育的分类

由于导致雄性不育性的因素很多，雄性不育性的表现也是多种多样的，因而对雄性不育性的分类也有不同的方式。

1.3.1 根据遗传方式分类

早期对植物雄性不育的研究不够深入，仅根据雄性不育的一些遗传方式进行解释和分类（秦泰辰，1978）。主要有：

（1）三型学说　Sears, E.R.于 1947 年在总结前人工作的基础上，将雄性不育性

概括为三种类型。

① 细胞质雄性不育类型（简称质不育型，又称母体遗传型） 细胞核内不带雄性不育基因，其雄性不育的遗传完全受细胞质遗传物质控制。这种类型的不育株与细胞质可育的父本交配，其子代总是不育的，在理论上是找不到恢复系的。

② 细胞核不育类型（简称核不育类型，又称孟德尔遗传型） 这种类型的不育性，完全受细胞核内雄性不育基因的控制。一般认为是由一对隐性基因控制的，其不育性很难保持而极易恢复，即没有保持系。其后代的育性分离符合孟德尔分离规律。

③ 质核互作类型（细胞质—核相互作用类型） 这种类型的雄性不育性是受细胞质和细胞核遗传物质共同控制的。其保持系和恢复系都能找到，有利于三系配套配制杂交种。

（2）二型学说 1956 年，Edwardson, J.R.在玉米雄性不育性的研究中，结合前人的工作，对 Sears 的三型学说提出了疑义，首创二型学说。指出，细胞质作用类型在自然界中是不存在的，应归入质核互作类型。为了统一名称，把原来叫做细胞质作用类型与质核互作类型并为一类，称之为细胞质作用类型；另一类型就是细胞核作用类型。

（3）核质协调学说（一型学说） 核质协调学说认为，二型学说中的细胞核作用类型是不存在的。所谓核基因控制的雄性不育系，都属于质核互作类型，即一型学说。

（4）雄性不育性数量性状的特征 认为雄性不育性不是质量性状而是数量性状，因为有些杂交试验的杂种后代其育性的分离呈连续性变异。

（5）雄性不育性受病毒的控制 认为植物病毒是控制雄性不育的一种因素。

1.3.2 根据雄性不育表型分类

Kaul（1988）依据基因型和表现型的差异，将植物雄性不育性划分为以下三个类型：

（1）结构性雄性不育 雄性器官结构显著异常，从而导致小孢子组织不能发育或者小孢子发生不能正常进行和完成，造成雄蕊群发育和分化异常、没有花药或花药畸形，而雌性器官则很少受到影响。

（2）孢子发生性雄性不育 雄蕊正常发育，但小孢子发生或雄配子发生出现缺陷，从而致使花粉不能产生或者虽然能产生但花粉异常、畸形，在花粉完全成熟前败育。

（3）功能性雄性不育 能形成正常花粉，但由于某种障碍使花粉不能到达自己或外源花朵的柱头，从而不能受精。这些障碍主要是：花药不开裂，花粉外壁发育不完全或不具有外壁，花粉不能转移至柱头以及花粉到达柱头后不能正常受精等。

1.3.3 根据雄性不育机理分类

随着科技的发展，对植物雄性不育的研究越来越深入和广泛。根据引起雄性不育的主要原因，可将植物的雄性不育分为以下三种类型（刘忠松等，2001）。

（1）遗传性雄性不育 是以遗传因素为主控制的不育类型。根据其是否可以遗传分为两类：

① 不遗传的类型　如染色体组不平衡，非整倍体等引起的不育，这类不育不只限于雄性，雌性也有。

② 可遗传的类型　它既可能纯粹由核基因突变所致，也可能由雄性育性基因处在不利的胞质条件下不能正常表达所引起。因此，往往把遗传的雄性不育类型又分为：核不育（NMS）类型和细胞质-核互作不育（CMS）类型。

（2）生理性雄性不育　具有正常可育基因型的植株在雄性发育过程中遇到不利条件（如极端温度、光照不足、干旱、化学药剂处理等）而引起雄性不育，这类雄性不育可随不利条件的消失而恢复育性。这类不育性是不遗传的。

（3）生态性雄性不育　具有不育基因型的植株在一定条件下雄性不育，而在适当条件下雄性可育的不育类型。其不育性是由特定基因型决定的，是可以遗传的，也叫生境敏感型雄性不育。

此外，Heslop-Harrison（1971）还曾将植物雄性不育性分为孢子体传递型不育和配子体传递型不育。

总之，对植物雄性不育性的分类可以有多种方法，白书农（2003）在 Kaul 综述的基础上，对目前所了解的植物雄性不育类型做了一个简单的概括（图 1）。即植物雄性不育首先可以分为环境胁迫所致的不育和遗传所致的不育，在遗传所致的雄性不育中，又可以分为核基因控制的和核质互作控制两类。

2. 植物雄性不育研究进展

2.1 植物雄性不育的细胞学研究

2.1.1 雄性败育的主要时期和特征

植物雄性不育的发生，主要是通过花粉形成和发育过程中发生的败育现象来表现的，而花粉的败育又表现在其败育的时期和特征不同而有差异。Laser 与 Lersten（1972）指出，双子叶植物不育花粉的败育高峰多在造孢细胞至四分体时期较多，而单子叶植物则在花粉的单核期至双核期败育较多。因此随着植物种类的不同，花粉的败育和形式多种多样，即使同一种植物如水稻的花粉败育也有不同类型，败育的时期和特征也有差异。但一般来说，不育系花粉的败育大多经过四个主要时期：造孢细胞至花粉母细胞增殖时期，减数分裂时期，单孢花粉时期(单核晚期)，还有双核和三核花粉时期败育的。其中前两个时期败育较少，通常都在花粉发育时期败育，尤其是在单核花粉时期败育最为普遍。

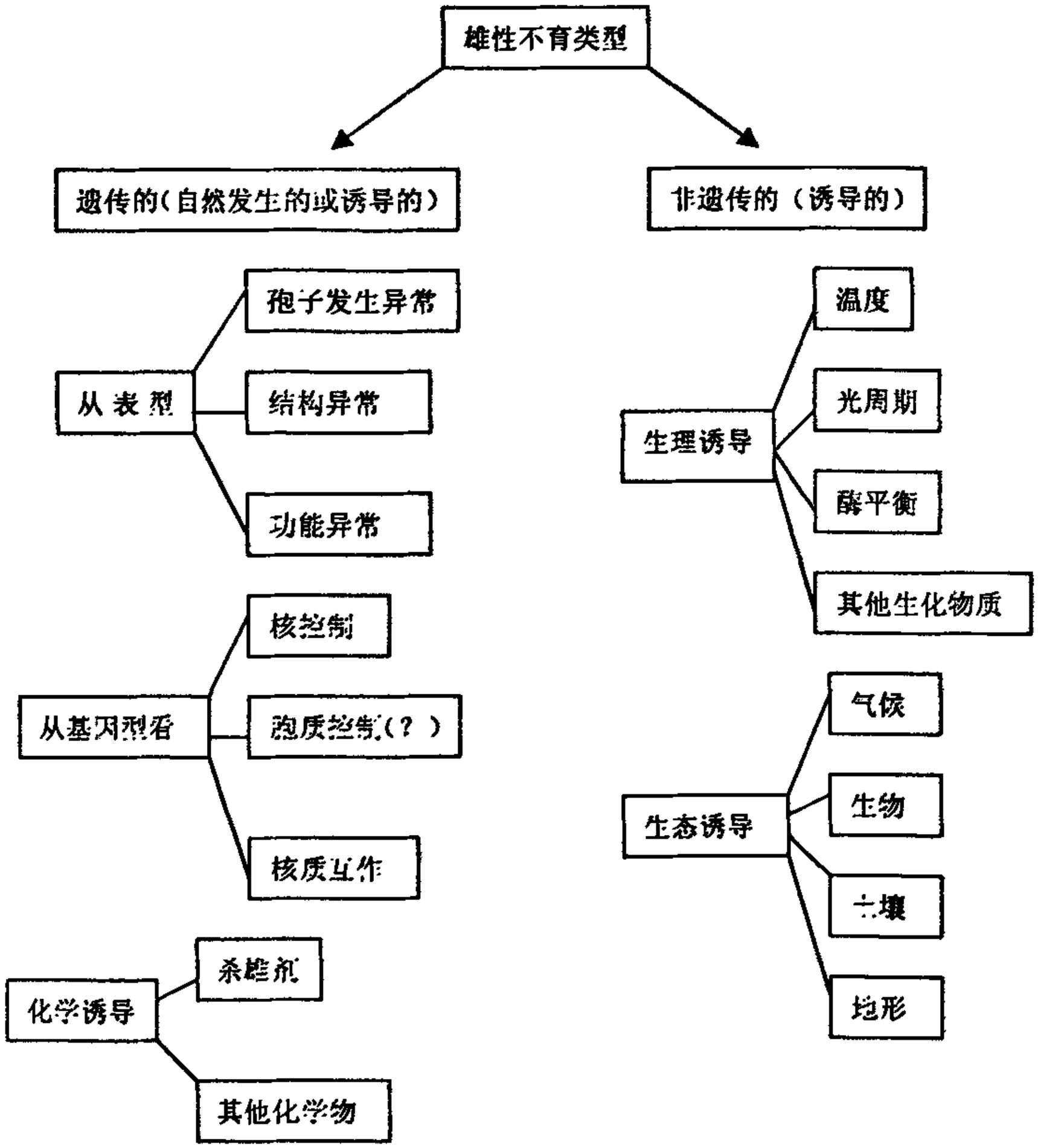


图 1　一种对雄性不育现象分类的方法（引自白书农，2003）

Fig. 1 A classification of plant male sterility (Bai Shu-nong, 2003)

丁德荣等（2001）利用光镜和透射电镜对几个大豆不育系小孢子发育的细胞学比较观察。结果表明，同一胞质在不同的回交世代败育途径和表现相似，主要发生在单核后期到二胞花粉早期，有的在小孢子单核靠边期的细胞质中产生不正常的空泡，接近成熟花粉时期细胞质部分解体、收缩；另一些花粉败育发生在二胞花粉期，初期原生质内小液泡比保持系增多，原生质内未形成淀粉粒，在生殖细胞远离营养细胞后，胞质呈现紊乱，生殖核与营养核消失，外壁内层及内壁停止发育，液泡增大，原生质部分解体。

2.1.2 药壁组织与雄性不育的关系

绒毡层：袁亦楠（2000）利用光镜和透射电镜对番茄雄性不育突变体95305的小孢子发育进行了细胞学观察。结果表明,小孢子的败育发生在小孢子母细胞时期、四分体时期以及单核小孢子时期。在这些时期中，由于绒毡层细胞多层径向分化，异常肥厚，挤压单核期的小孢子，致使小孢子母细胞被破坏提早解体。韩爱华等（2004）利用石蜡切片法，观察比较了“新梨7号”及其父母本花药发育和花粉发育过程中细胞学上的变化特征。研究结果表明：“新梨7号”梨花器小，花药干瘪，几乎无花粉粒，表现出雄性不育的空囊花药。花粉败育的主要原因可能是：绒毡层细胞在花粉母细胞时期出现畸形、提早解体，致使绝大多数小孢子母细胞不能正常发育，即使有的小孢子母细胞可以进行减数分裂，但形成的小孢子四分体也不能正常发育成为成熟的花粉粒，导致最终败育。

维管束：维管束连接着花丝与花，起着吸收水分和运输养料的作用。关于植物雄性不育系雄蕊中的花丝与花药维管束出现的异常现象早已有报导。徐树华（1980）在水稻红莲型华矮15不育系中也观察到相邻的花丝合并的现象。花丝的合并有二联和三联型，在药隔部分有薄壁细胞排列紊乱、大小不均匀和维管束分化不全、发育不良等异常现象。而WA型华矮15不育系，除了药隔薄壁细胞排列紊乱程度更为严重外，药隔维管束发育不全现象亦更为严重，可看到维管束的极度退化，甚至发生缺失或中断，在药隔维管束发育异常的区域，还可以观察到败育或正在败育的花粉。王台等（1992）观察到水稻农垦S58的可育花药的药隔组织与普通水稻品种相似，但农垦S58不育花药在小孢子母细胞时期和花粉母细胞减数分裂时期，药隔维管束的薄壁细胞的壁薄发育差，在维管束中无导管和筛管。在单核晚期，虽有完整的木质部和韧皮部，但只有分化较差的导管和筛管，并且其薄壁细胞也发育不良或退化，鞘细胞皱缩，由绒毡层的细胞质构成的原生质团不解体。

2.2 植物雄性不育的生理学研究

2.2.1 物质代谢系统与雄性不育的关系

核酸的变化：核酸是蛋白质合成的模板和运载原料的工具，而蛋白质是组成花粉的物质基础，酶蛋白是参与植物体一切生理生化代谢活动的催化剂。在雄性不育的花药中，幼穗发育初期，几乎与雄性可育花药的核酸含量相等。但是在小孢子阶段，由于绒毡层结构紊乱，雄性不育花药中形成核酸的物质得不到补充，在核苷酸形成时，DNA从退化的绒毡层和核中泄露出来。这些DNA被花粉母细胞吸收用于合成过程，或部分转化为RNA。因此，花药部位，低水平的DNA和RNA可能成为小孢子发育的限制性因素。江勇等（1997）用组织化学方法发现珍汕97A花粉细胞RNA

含量在双核期显著下降，这是不育系花粉败育的一个重要生理特征。杨金水等（1995）用野败不育系黄化苗为材料，采用RFLP技术进行分子杂交表明：野败不育系与保持系线粒体DNA在组成上存在明显的差异。

氨基酸的变化：氨基酸是氮同化的最初产物，是建造蛋白质的砖石。肖翊华等（1987）研究了光敏核不育水稻败育在不同人工条件下，花粉不同发育时期的游离氨基酸的变化。发现在所检测的17种游离氨基酸中，与花药败育密切相关的氨基酸为脯氨酸，其次是丙氨酸。脯氨酸是花粉中氨基酸的一种储藏形式，可以转变成谷氨酸等其他氨基酸。因而脯氨酸含量的降低，必然会影响到蛋白质的生物合成。谷氨酸在生物体内又可以转变为酮戊二酸，参与糖代谢。脯氨酸在花粉中通常与含量丰富的碳水化合物相配合，具有提供营养、促进花粉发育、发芽和花粉管伸长的作用。对苎麻（刘飞虎等，2000c）不育系的研究也表明，脯氨酸及其他游离氨基酸含量在不育花药与可育花药之间表现出差异。

蛋白质的变化：蛋白质是基因表达的最终产物，控制植物体的性状。由于雄性不育植物中DNA和RNA的变化，必然会导致蛋白质变化。蛋白质对小孢子的发育极为重要，不仅可为植物的生命活动提供能量和为其它物质的合成提供中间产物，又是细胞的重要组成部分，可溶性蛋白质中包含了各种酶原、酶分子和代谢调节物，在花药和小孢子的发育过程中具有决定意义。一般认为植物生殖生长过程需要有旺盛的蛋白质代谢，否则生殖器官的发育将走向异常，而雄性器官对此反应更为敏感（刘飞虎等，2000c）。朱英国等（1979）对水稻红莲不育系及其保持系材料的研究证实：花药中的游离组蛋白，总的趋势是不育系少于保持系。植株体内蛋白质合成能力的降低，可能是导致植物雄性不育的原因之一。在苎麻（刘飞虎等，2000c）、玉米（夏涛等，1993）等作物中发现雄性不育花药的蛋白质含量低于对应可育系。

碳水化合物的变化：碳水化合物是植物生活代谢的产物，也是其生存的物质基础，C/N比例的变化调控可以调整植物体由营养生长进入生殖生长。农垦58S-SD除了在第一次枝梗原基分化期至雌雄蕊原基形成期，叶片中除蔗糖含量下降外，淀粉、还原糖和总糖的含量均有上升的趋势（王台等，1991）。邓明华等（2002） 在辣椒细胞质雄性不育系9704A和8214A的研究中发现，在辣椒花蕾的发育过程中，不育系大花蕾的可溶性糖含量呈明显下降趋势；而保持系可溶性糖含量一直升高，并在所有阶段均高于不育系。

有害物质的变化：过氧化氢和丙二醛（MDA）是对细胞极为有害的物质。过氧化氢能通过抗坏血酸-谷胱甘肽循环消除，也能转变成氧化活性更强的羟基自由基，对蛋白质、核酸和脂类生物大分子产生破坏作用。MDA可作为交联剂使膜蛋白、酶分子和DNA等大分子发生交联反应。因此，MDA含量的高低，可以反映细胞受损的

程度。对小麦（赵会杰等，1996）和水稻（陈贤丰等，1991）不育系的生化分析表明，不育系花药中大量积累过氧化氢和MDA，导致代谢失调、脂膜过氧化。脂膜过氧化增强是不育花药的一个普遍特征。

2.2.2 能量代谢系统与雄性不育的关系

呼吸作用：呼吸作用是重要的生命现象。呼吸速率既是生物体呼吸作用强弱的指示，也是生物体能量代谢程度的宏观表征。雄性不育系花药呼吸强度低于可育系花药，说明雄性不育花药中呼吸作用出现了缺陷（刘忠松，1987）。

呼吸途径：高等植物呼吸代谢有多条途径，在植物体内同时存在和运转，内外因素可以造成各条呼吸链代谢途径间在程度和方向上的差异。高等植物的氧化还原有两条电子传递途径：对氰化物敏感的细胞色素氧化酶途径和对氰化物不敏感的交替氧化酶途径(AOX)。交替氧化酶途径又称抗氰呼吸途径。细胞色素氧化酶途径最终产生ATP，而抗氰呼吸途径不合成ATP，起平衡碳代谢和电子传递作用。AOX与三羧酸循环协同工作，满足植物增加碳骨架的需要。Musgrave等（1986）研究了玉米CMS及其保持系花药的总呼吸和抗氰呼吸，发现不育花药缺乏抗氰呼吸途径，而保持系抗氰呼吸途径正常。玉米（夏涛等，1988）、水稻（陈贤丰等，1992）CMS系花药的抗氰呼吸研究都证实了这一点。

ATP的变化：ATP是能量的携带者和贮藏者，它参与植物体内各种代谢途径的调节。ATP本身是核酸合成的前体物质之一，而其他几种核苷酸前体也只能从ATP转化而来。对几个光敏、温敏核不育水稻品种的研究发现：不育花药ATP含量下降，核酸和蛋白质合成活性低，导致酶的数量和种类减少，致使DNA不能正常合成，染色体不能加倍，细胞分裂停止，最后分解大于合成，花粉发育停滞而败育。

2.2.3 酶活性与雄性不育的关系

酶是生物体内的一种特殊催化剂，它由活的生物体合成。酶的活性取决于其蛋白质结构的完整性，任何破坏酶蛋白的因素都能导致酶活性的丧失。酶有调控代谢反应的功能。多个代谢反应综合的集中表现，便是性状和生理功能的体现。正是由于这种酶、代谢和生理功能的相互关系，使酶活性的变化与育性的变化有着密切的关系。植物体内酶的种类和存在量的多少及酶催反应的方向，都会直接影响到植株生长发育的强弱，可育与不育等的特性。

过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）和超氧化物歧化酶（SOD）：植物在光呼吸等代谢过程中，会有许多过氧化氢产生，这些过氧化氢可以通过 Haber-Weiss 反应（$H_2O_2+O_2\rightarrow OH^-+OH+O_2$）产生毒性更强的羟自由基。羟自由基可引发脂质，尤其是膜不饱和脂的过氧化，使生物膜结构遭到损害，改变蛋白质（包括酶）结构，

影响其功能；损伤 DNA 等生物大分子的结构与功能等。然而在生物进化过程中，也形成了抵抗活性氧伤害的防御系统。超氧化物歧化酶（SOD）清除活性氧形成过氧化氢，过氧化物酶（POD）和过氧化氢酶（CAT）则将过氧化氢进一步分解。同时，生物体内存在的谷胱苷肽、抗坏血酸、维生素 E 等许多小分子活性氧清除剂，使体内活性氧保持在较低水平。

赵会杰等（1999）对三种类型（T、K、V 型）小麦胞质雄性不育系的研究表明，在花粉发育到二核期和三核期，不育系花药的 SOD，CAT 活性显著低于保持系，POD 活性则高于保持系。不育系的活性氧产生速率明显加快，脂质过氧化导致丙二醛（MDA）大量积累。段俊等（1996）的研究也表明，玉米不育系叶片和雄穗中的活性氧产生效率、丙二醛含量较高；而 SOD、POD、CAT 活性均较低。不育系的败育特征不仅表现在生殖器官的雄穗中，在营养器官的叶片中也有所表现。

细胞色素氧化酶（COD）：在生物氧化还原系统中，细胞色素氧化酶是一种重要的氢载体。含铁、铜细胞色素氧化酶是线粒体膜的标志酶，在能量代谢中起重要作用。目前对于细胞色素氧化酶的活性是否能引起雄性不育尚存争议。

2.3 植物雄性不育与环境因素关系的研究

2.3.1 环境因素影响雄性发育性

生物体的新陈代谢和生长发育主要受遗传因素和环境条件的调控。遗传信息规定了个体发育的潜在模式，但它的实现很大程度上受环境条件的影响。外源和内源信号作用于特定细胞，引起基因不同水平的表达，导致生理反应的变化。植物雄性育性的表达同样受到环境条件的调控。在不同生境条件下，雄性育性会发生转换，育性转换有量变式的，也有质变式的。这种特性为人工生理调控雄性育性创造了条件。环境条件可分为两类：一类是自然环境，如光照、温度；另一类是人工环境，如用物理、化学方法进行处理。在一个可育基因型品种中，由于受到干旱、高温、营养缺乏、人为处理等影响，就可能引起生理上的雄性不育。而雄性不育基因型也不总是雄性不育的，在适当条件下可以恢复或部分恢复育性。

2.3.2 生态因素调节雄性育性的生理生化过程

外界信号通过细胞膜进入细胞，逐步引起细胞内各种物质，主要是蛋白质的变化，各种蛋白质综合作用引起细胞发生生化反应，这个过程称为信号传导。细胞的生长、分化及形成组织器官，都依靠信号传递。信号传递需要四个基本条件：信号；接受信号的受体；介导并能放大信号的信使；对信号发生反应的效应器。

植物种子萌发并经过一定的营养生长后就能感受环境信号的刺激，进入生殖生长。这种能感受外界信号刺激的状态叫感受态。植物对环境的感受，有的由单基因

控制，有的由多基因控制；有的由隐性基因控制，有的由显性基因控制。小孢子形成和花粉发育是许多基因按一定时间和空间顺序表达的结果。有的特异性基因在减数分裂结束后到小孢子分裂前表达，另一部分在小孢子分裂后到花粉成熟时表达。这与花粉败育的敏感时期是大致吻合的。

光作为主要的环境因子，不仅提供光合作用所需要的能量，而且也触发植物形态变化、质体分化、新陈代谢等重要反应。光敏色素普遍存在于植物细胞中，是一种担负着吸收和传递外界光信息的微量色素蛋白。植物利用光敏色素感受光作用，进而推动一系列生理生化过程。

3. 苎麻雄性不育的研究进展

刘飞虎等（2000a）对 3 份天然苎麻雄性不育系和 13 份经药剂诱导获得的雄性不育系，通过田间观察结合花粉压片观察的方法，鉴定供试苎麻不育系的育性特征和分析育性遗传方式，发现供试苎麻雄性不育系分为 4 种类型：Ⅰ型为无雄蕾型；Ⅱ型雄蕾不膨大，无花粉粒，最后变黄枯落；Ⅲ型雄蕾可膨大至 1.6-1.8mm，淡黄色，无可育花粉粒，最后变褐枯落；Ⅳ型有个别或少量雄蕾可开放，但无可育花粉粒，其它方面同Ⅲ型。

在生理学方面，刘飞虎等（2000c）比较分析了几个苎麻雄性不育系及其近等基因可育系叶片中的蛋白质、氨基酸、可溶性总糖及全钾含量等的差异后发现，同可育系比较，苎麻雄性不育系的叶片中粗蛋白质、氨基酸含量减少，但游离脯氨酸含量增加；在不育系叶片水解氨基酸中，以天门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、胱氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸和精氨酸减少尤明显。这些物质代谢的变化，可能是导致苎麻雄性不育的原因。但叶片可溶性糖及全钾含量与苎麻雄性不育似无明确关系。

此外，汪怀建等（2000）应用现蕾促进率（%）和感温指数来反映 6 份苎麻雄性不育系的光温反应特性，结果表明：供试材料的感光性可分为强感光和弱感光 2 类；其感温性可分为强感温、中感温和弱感温 3 类。刘飞虎等（2000b）以 GS13-942、GSA-2、SS387、SS370 等 7 个不育系为供试材料,在不同温度条件下采用不同日长(9.5~12.5h/d)光照处理,分析供试苎麻雄性不育系的发育对温度和日照长度的反应。结果发现，不同供试材料在特定条件下的营养生长进度较为一致，而生殖生长进度差异较大；高温主要促进营养生长阶段的发育，而短日照主要促进生殖生长阶段的发育；短日高温条件明显加速苎麻不育系的发育速度，但高温的促进作用随日照长度增加而减弱，以至消失。

4. 本研究的目的意义

植物的雄性不育性是一个与农业生产有密切关系的植物学性状，是基因型与环境相互作用在发育过程中表达的结果。雄性不育因免去了去雄的麻烦可作为遗传工具用于开发利用作物杂种优势和进行轮回选择、回交等育种研究，因此受到遗传育种家的高度重视。利用植物的雄性不育性培育雄性不育系，再借助遗传工具来大量生产杂交种子，杂种优势就得以在生产上应用。作物雄性不育杂种优势的利用能使作物生产力显著提高，目前几乎所有主要农作物上都已经或正在开始利用雄性不育杂种优势，雄性不育杂种优势已经是并且还会是作物育种的主要手段和发展方向。

苎麻是一种优良的纺织工业原料和主要出口产品，在国民经济中占重要地位。随着我国对外贸易规模逐步扩大，苎麻这一中国特色产业必将有更大发展。苎麻雄性不育杂种优势利用正受到普遍重视，而且已有优势组合用于生产。苎麻雄性不育作为一种优良生物性状，其细胞学观察的报导却相对较少，仅限于雄花蕾外形观察和花粉压片观察，并未对雄花蕾进行解剖观察，可育系雄花蕾发育和不育系雄花蕾败育的细胞学特征尚不清楚。另外，虽然开展过苎麻雄性不育系生理生态特性和遗传初步分析，但还很有必要进一步深入探讨。因此，对苎麻雄性不育系进行细胞学观察并进一步探讨其生化机理就显得尤为重要。本研究采用苎麻雄性不育系 SS370、GS14-1 及其对应保持系 GS13-X_1、GS13-X_2 为材料，观察对比小孢子发育的细胞学特征，比较分析生理指标差异，为苎麻雄性不育的基础理论研究积累资料并为今后苎麻杂种优势利用提供理论依据。

第二章　苎麻雄性不育系的细胞学研究

苎麻通常可由麻籽萌发成幼苗，或由种根萌发成幼苗。麻株前期的生长表现为根、茎、叶的生长，称营养生长。当麻株营养器官发育到一定程度和根部营养物质积累到一定程度后，在短日照条件的作用下，麻株体内会发生一系列的生理变化。麻株由营养器官的生长过渡到生殖器官的生长，称生殖生长。它们在形态上表现为叶腋的副芽由原基的潜伏状态转化为形成花芽的活动状态，并朝着形成花的方向发育。目前，对雄性不育苎麻的雄花器官分化发育的报道相对较少。本章将对苎麻的两个雄性不育系 SS370、GS14-1 及其对应保持系 GS13-X_1、GS13-X_2 雄花器官的分化发育进行观察，期望揭示雄性败育的时期与特征。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为两个雄性不育系苎麻 SS370、GS14-1 及其对应保持系 GS13-X_1、GS13-X_2，所有供试材料均按大田生产要求进行育苗、移栽及田间管理。

1.2 方法

从现蕾起于田间观察所有供试材料麻株的雄蕾发育情况并按不同发育时期取雄蕾带回室内，放入 FAA 固定液中，抽真空后保存。FAA 固定液配方为：每 100ml FAA 含 70%乙醇 86ml，甲醛 8ml，冰醋酸 6ml。

取出部分材料，尽量去掉花轴，依次放入 50%、70%、80%、90%、100%的酒精中各 20 分钟，再转入 100%的酒精中 40 分钟，进行梯度酒精脱水；之后放入 1：1 的乙醇/二甲苯中 90 分钟，转入纯二甲苯中 90 分钟，换二甲苯再浸泡过夜，进行透明；次日将材料转入 1：1 的石蜡/二甲苯，58℃ 烘烤 6 小时，放入石蜡中浸泡 6 小时，换石蜡再浸泡 4 小时，然后制成适合大小的蜡块，进行切片，切片厚度为 7μm。

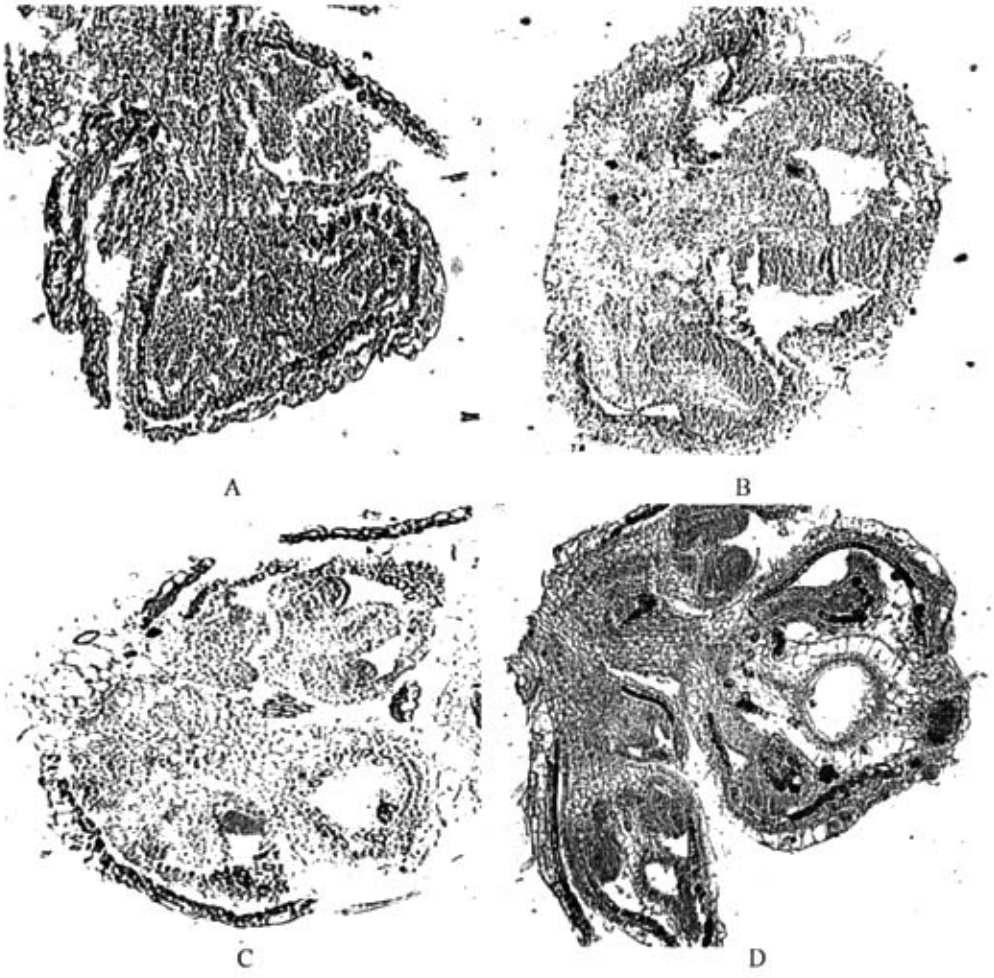
用水浴法将蜡带粘于涂有明胶的载玻片上，烘干后放入二甲苯中脱蜡，第一次 105 分钟，第二次 75 分钟，然后依次放入 100%、100%、90%、80%、70%、30%的酒精中各 5 分钟，转入蒸馏水 5 分钟，之后放入 0.5%番红的 50%酒精溶液中染色过夜（8 小时）；次日取出用蒸馏水洗掉浮色，再依次放入 30%、50%、70%、80%、90%的酒精中脱水各 5 分钟，然后放入 0.5%固绿的 95%酒精溶液中染色 6 秒，转入 100%、100%酒精中各 5 分钟，放入二甲苯中 5 分钟，2 次，风干，中性树胶封片，烘干制成永久切片；徕卡显微镜下观察并照相。

2 结果与分析

2.1 苎麻雄性不育系雄蕊的败育特征

2.1.1 保持系 GS13-X_1 雄蕊及小孢子发育特征

苎麻为复总状花序。花序分化时，副芽顶端细胞分裂加快，横径加宽，显现一个比较平坦的半圆体，就是花序原基，以后由它分化出花序轴和许多分枝轴。之后在分枝轴周围，分化出几个小的突起，这些小突起就是雄花的原基(图 2-A)。雄花的原基继续膨大，基部产生的花被原基突起逐渐向花的顶部伸长，形成花蕊的一种保护机构。从纵切面观察，花的原基呈"山"字形(图 2-B)。花被伸长的同时，圆锥状的花原基中央突起，形成雌蕊原基，在其周围出现四个小突起，就是雄蕊原基(图 2-C)。雌雄蕊原基继续分化，雌蕊原基首先伸长，然后在基部分化出心皮，随着花的继续发育，心皮向上伸长并内卷，发育成子房。原来雌蕊原基的顶端，位于心皮底部，发育为珠心原始体(图 2-D)。但珠心原始体并不随着整个花的发育继续分化，而是逐



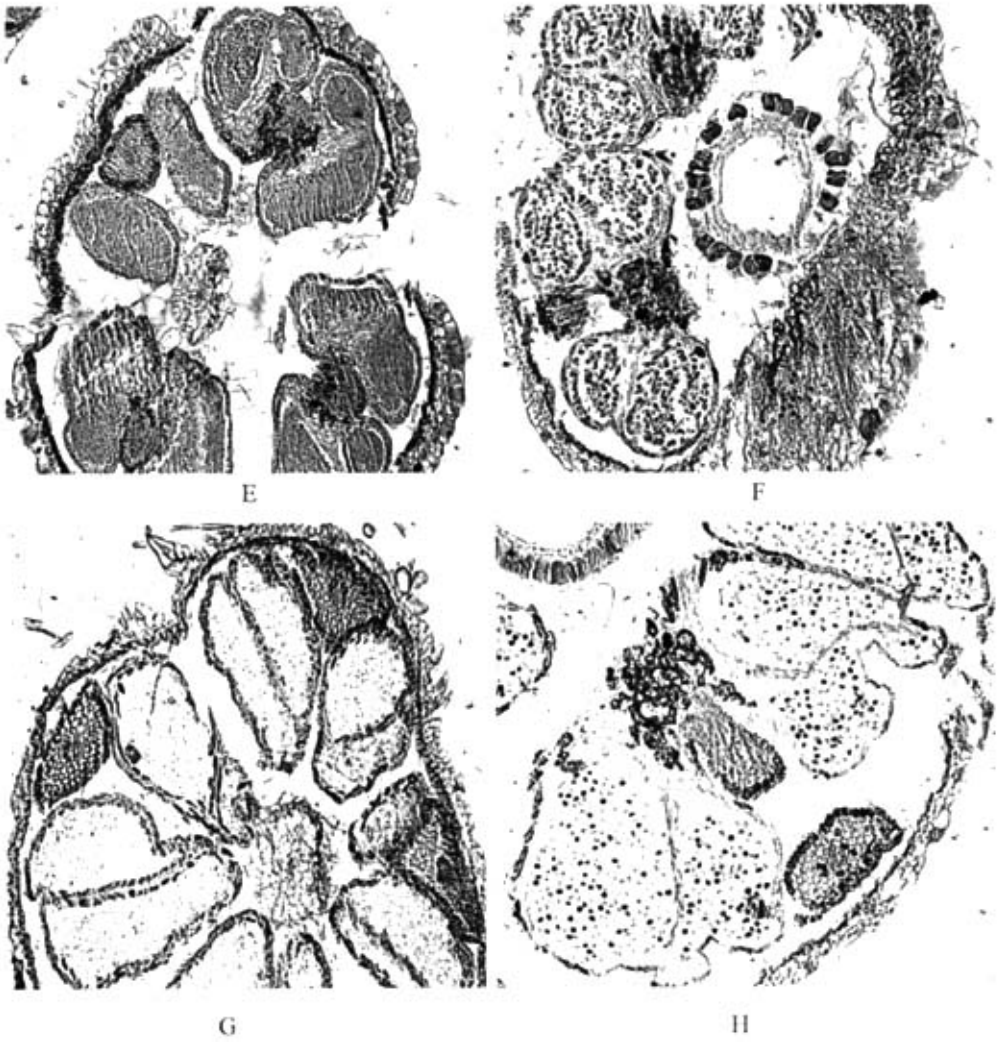


图 2 保持系 GS13-X_1 雄蕊及小孢子发育解剖图

A 雄花原基分化；B 花被原基伸长；C 雌雄蕊原基分化；D 雄蕊原基伸长和子房形成；E 花药形成；F 花粉母细胞形成；G 绒毡层加厚；H 花粉形成。

Fig. 2 Development pattern of stamens and microspores in ramie maintainer line Gs13-X_1

A. differentiation of primordia of male flower. B. elongation of primordia of perianth. C. differentiation of primordia of stamen and pistils. D. elongate primordia of stamen with newly formed ovary. E. formation of anther. F. formation of microspore mother cell. G. thicken of tapetum. H. formation of pollen.

渐萎缩消失。雄蕊原基最初呈小丘状，随后伸长呈棒状，外形上没有花丝和花药的变化，内部由多列的一群同形的幼期细胞组成（图 2-D）。雄蕊原基继续发育，分化

为花丝和花药。在横断面上，花药呈现 4 个或 2 个瓣状结构，每瓣以后发育成一个花粉囊。花药内部发生分化，外面为表皮层，表皮下是较大的细胞，具有较大的核与核仁，细胞质较浓，为孢原细胞。靠中轴的几列细胞是药隔的原始细胞，以后分裂形成药隔(图 2-E)。

花药进一步分化，最外方是表皮细胞，表皮内孢原细胞平周分裂，产生中层、绒毡层和造孢细胞。造孢细胞通过几次有丝分裂形成花粉母细胞。花粉母细胞排列比较紧密，呈多角形（图 2-F）。此后，核与核仁显著增大，细胞开始进行减数分裂，成为四分体。当花粉母细胞进行减数分裂时，中层细胞开始变形，然后逐渐消失。绒毡层细胞逐渐长大，细胞核增殖为 2 个，和周围细胞相比，细胞和细胞核的体积都较大(图 2-G)。四分体形成后不久，花粉母细胞的壁破裂，花粉粒从中放出，呈球形，核居中央。随后核与核仁扩大，形成外壁，细胞中部出现液泡，核居一侧，然后花粉粒进行一次分裂，形成 2 个细胞核(图 2-H)。

2.1.2 不育系 SS370 败育特征

雄性不育苎麻 SS370 败育较早，在雄花花序分化期便出现败育，表现为在叶腋处出现褐色的小点，数日后脱落。经鉴定是枯萎的雄花序，由于花序已完全干枯，无法进行切片观察。

2.1.3 保持系 GS13-X_2 雄蕊及小孢子发育特征

保持系 GS13-X_2 雄蕊及小孢子发育特征与 GS13-X_1 的雄蕊及小孢子发育特征相同。首先出副芽分化出花序原基，花序原基分化出花序轴和分枝轴，之后分化出雄花原基。雄花原基膨大，产生花被原基，花被原基伸长形成保护结构，雌雄蕊原基开始形成 (图 3-A)。随后，雌蕊原基伸长，分化出心皮，发育成子房，在子房底部可看到珠心原始体(图 3-B)。雄蕊原基继续伸长，分化出花丝和花药，花药内部发生

A　　B

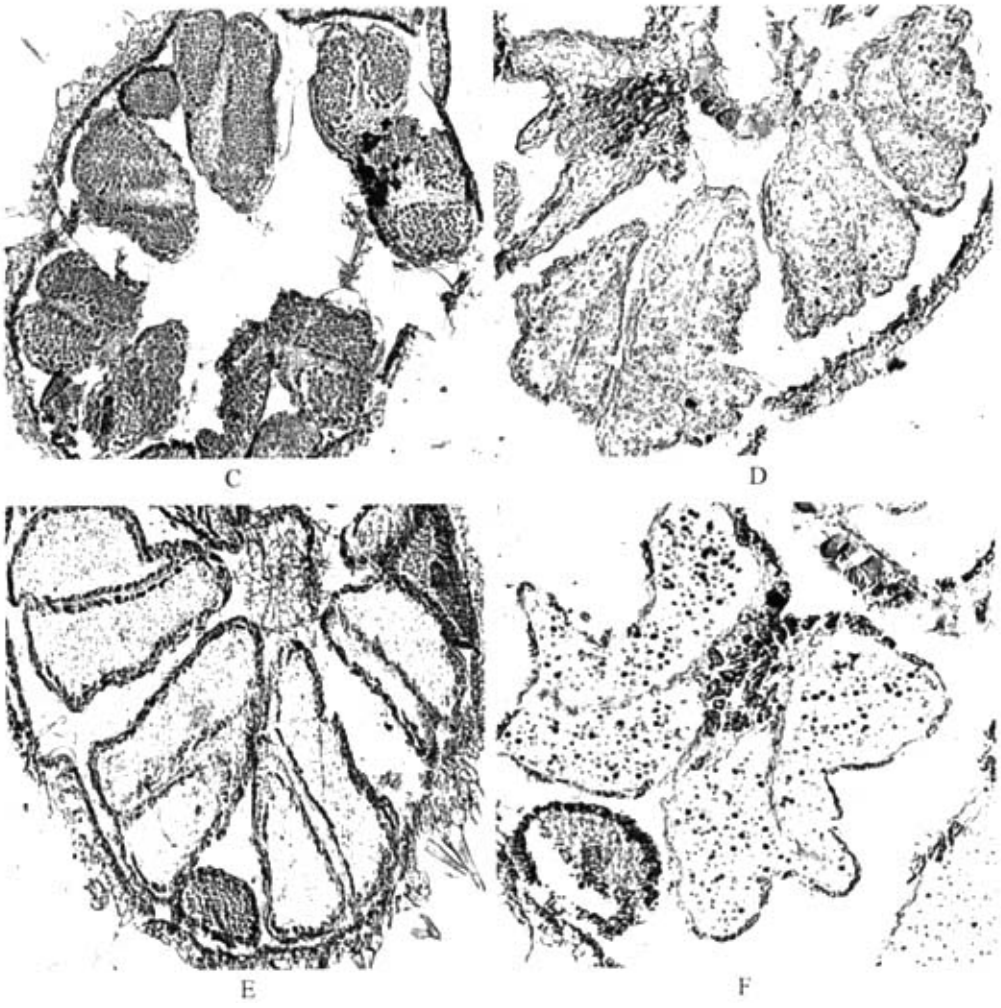


图 3 保持系 GS13-X_2 雄蕊及小孢子发育解剖图

A 雄雄蕊原基分化；B 雄蕊原基伸长和子房形成；E 花药形成；D 花粉母细胞形成；E 绒毡层加厚；F 花粉形成。

Fig. 3 Development pattern of stamens and microspores in ramie maintainer line Gs13-X_2

A. differentiation of primordia of stamen and pistils. B. elongate primordia of stamen with newly formed ovary. C. formation of anther. D. formation of microspore mother cell. E. thicken of tapetum. F. formation of pollen.

分化，外面是表皮层，表皮下是孢原细胞，靠中轴的是药隔的原始细胞(图 3-C)。花药进一步分化，孢原细胞分裂产生中层、绒毡层和造孢细胞，造孢细胞有丝分裂形成花粉母细胞（图 3-D)。接下来，花粉母细胞减数分裂形成四分体，中层细胞逐渐消失，绒毡层加厚(图 3-E)。不久，花粉母细胞壁破裂，花粉粒放出，然后花粉粒进

行一次分裂，形成 2 个细胞核(图 3-F)。

2.1.4 不育系 GS14-1 败育特征

雄性不育苎麻 GS14-1 败育特征与 SS370 略有差异。在 GS14-1 叶腋处能看到雄花序形成，但 2 至 3 天后便发生枯萎，脱落。通过切片观察发现，较多情况下都能

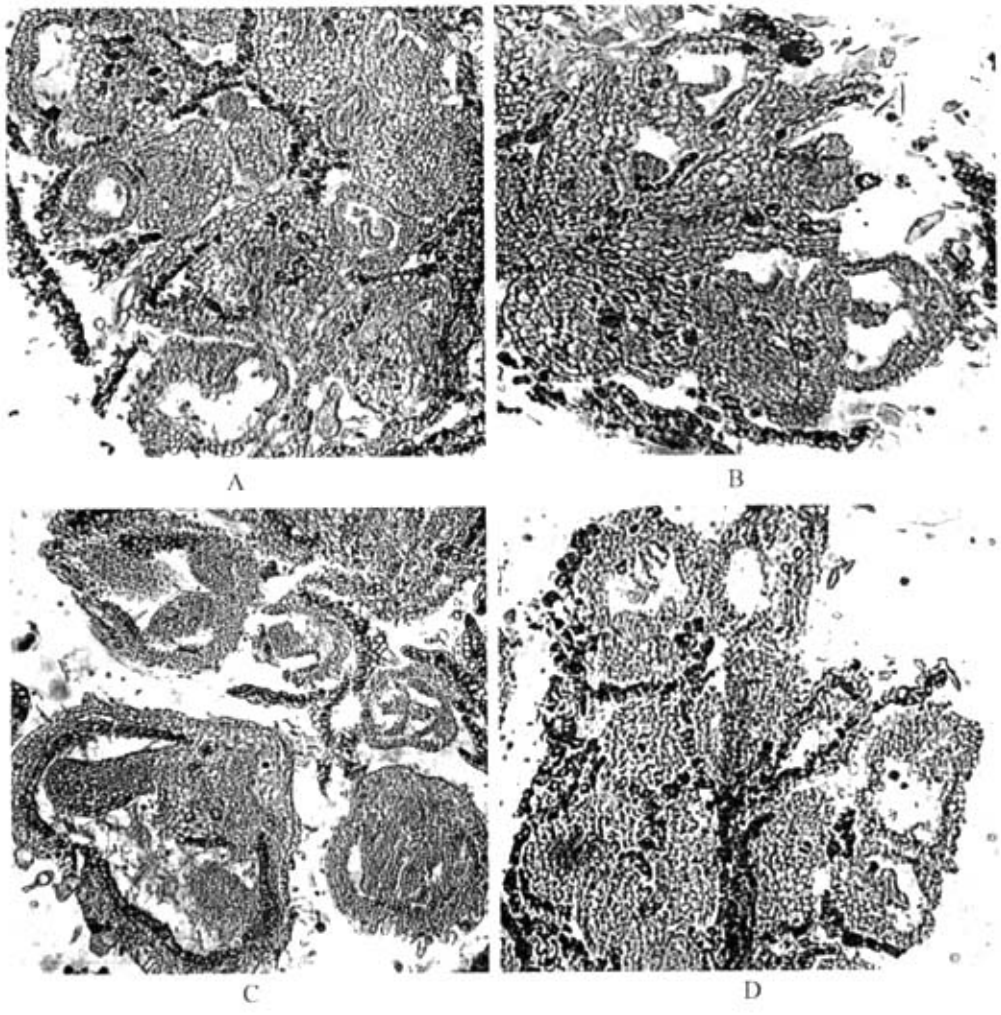


图 4 雄性不育系 GS14-1 雄蕊发育解剖图

A~B 雄蕊原基退化；C~D 雄蕊原基畸形。

Fig.4 Development pattern of stamens in ramie male-sterile line GS14-1

A~B. degenerate primordia of stamen. C～D. abnormal primordia of stamen.

看到花被原基突起并向花的顶部伸长，但雄蕊原基分化出现异常，有的出现雄蕊原基退化(图 4-A,B)，有的则出现雄蕊原基畸形(图 4-C,D)。

3 讨论

关于植物雄性不育系败育的特点，Laser 和 Lersten（1972）曾指出，败育几乎发生在花粉发育的所有阶段上，双子叶植物花药败育高峰多在四分体形成之前，而单子叶植物雄性败育多发生在花粉粒的单核期至二核期。刘春光等（1995）研究发现，D^2 型胞质雄性不育小麦花粉败育起始于单核—双核期，表现为败育期长和败育方式多样化。夏涛和刘纪麟（1989）发现玉米 CMS-T 和 CMS-C 在不同的核背景上表现不同的败育途径，而 CMS-S 在所研究的核背景上表现出较稳定一致的小孢子发生和败育行为。水稻的雄性败育在细胞形态学上更是有多种形式，按照花粉的败育时期及其形态特征，可以分为无花粉型（造孢细胞或花粉母细胞时期败育）、典败型（单核期败育）、圆败型（二核期败育）、染败型（三核期败育）和核增生花粉败育类型（具 4 核或多核）等五种败育途径（朱英国，2000）。

双子叶植物方面，菜薹细胞质雄性不育系小孢子败育有 59.6%发生在孢原细胞分化之前（董庆华等，1997）；秋冬萝卜雄性不育系 64A 呈现败育的时期是单核小孢子内开始出现小液泡（粟翼玟等，1995）；辣椒雄性不育系雄性败育发生在四分小孢子形成以前和减数分裂末期 II 阶段（耿三省等，1994）；大白菜细胞质雄性不育系花药发育受阻于孢原细胞阶段，不形成药室，属无花粉型（韩玉珠等，1999），而核不育大白菜花粉败育发生在四分体时期或四分体形成以后（张成合等，1993）；棉花洞 A 型核雄性不育株花粉在发育的全过程中都会发生败育（刘金兰等，1994），而陆地棉洞 A 型衍生核不育雄性不育系 473A 小孢子主要败育时期是单核早期（张天真和潘家驹，1991）。胞质雄性不育棉花的雄性败育有的发生在造孢细胞增殖或小孢子母细胞形成时期，有的在减数分裂时期（王学德等，1998）。

以上研究表明，不同植物雄性不育材料其雄蕊（小孢子）败育发生的时期及特点各不相同，即使是同一植物材料的不同雄性不育类型，其雄性败育时期和特点也不一样。

根据本实验的观察，虽然两个保持系 GS13-X_1 和 GS13-X_2 雄蕊和小孢子发育特征相同，但其对应不育系 SS370 和 GS14-1 的雄性败育特征却各不相同。SS370 的雄性败育发生更早，败育更彻底，在雄花花序分化期便出现败育；GS14-1 的雄性败育发生稍晚，多在雄花被形成后雌雄蕊原基分化期发生败育，因而通过解剖能看到雄蕊原基的各种异常情况。同其它双子叶比较，苎麻雄性不育系的不育特征表现得更早，其遗传学和生理学机理值得进一步研究。

第三章　苎麻雄性不育系的生理学研究

植物遗传型雄性不育性的发生是由不育基因控制 mRNA 转录、蛋白质翻译、生化反应、形态构建的最终结果。在雄性不育基因的表达过程中，包括一系列的物质和能量代谢，涉及各种复杂的生化反应，对植物雄性不育系的生化成分进行比较研究，有助于了解雄性不育产生的生化过程和发生机制，对深入了解和掌握雄性不育的调控机制具有重要意义。

1 丙二醛

植物细胞质外由一层膜包裹着，这种膜具有独特的生物学功能，对细胞具有保护作用。当细胞质膜受到损伤或破坏时，细胞的生物学功能将受到影响或丧失。Laser 等（1972）曾报道作物雄性不育花粉在发育过程中内膜及细胞器膜解体退化，但对造成这一现象的原因不十分清楚。赵会杰等（1996a）的研究表明，小麦胞质雄性不育系花药的丙二醛（malondiadehyde，MDA）含量在单核、二核和三核期均高于保持系，三核期尤为明显。本节将对苎麻雄性不育系及其对应保持系叶片中丙二醛含量进行探究。

1.1 材料与方法

1.1.1 材料

供试材料为两个雄性不育系苎麻 SS370、GS14-1 及其对应保持系 GS13-X_1、GS13-X_2，所有供试材料均按大田生产要求进行育苗、移栽及田间管理。

叶片取样：每个材料选取生长基本一致的植株 8 至 10 株，分别于苎麻营养生长期（出苗 40 天）、现蕾初期、壮蕾期、初花期和盛花期（接近凋谢）摘取植株最上部全展的功能叶片，装于冰箱带回室内，立即放入超低温（-70℃）冰箱保存，用于生理指标测定。

花蕾取样：由于两个不育系花蕾在现蕾不久后便枯萎脱落，无法与其保持系进行对比，因此不采用花蕾取样。

1.1.2 方法

1.1.2.1 提取液的配制和粗酶液的提取

贮备液的配制：贮备液 A：0.2mol/L 三羟甲基氨基甲烷（24.2g 三羟甲基氨基甲烷溶于蒸馏水中，定容到 1000ml）。贮备液 B：0.2mol/L 盐酸（浓盐酸 17.1ml 用水稀释，容量瓶定容到 1000ml）。

提取液的配制：配制 50mmol/L Tris-HCl （pH7.0）缓冲液，内含 1%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。250ml 贮备液 A 和 225ml 贮备液 B 混合，调节 pH 至 7.0，加入 10gPVP，定容到 1000ml。

粗酶液的提取：称取 1g 叶片（避开主叶脉），加液氮研磨成粉状，加入适量石

英砂和 PVP 以及 200μl β—巯基乙醇，再加入 10ml 提取液进行研磨，匀浆后在 4℃下 10,621g 离心 25min，上清液即为粗酶液，将其转到刻度离心管中放入超低温（-70℃）冰箱保存。

1.1.2.2 硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量

反应液的配制：配制含 0.5%硫代巴比妥酸（TBA）含 20%三氯乙酸（TCA）溶液。称取 200gTCA 溶解于水中，搅拌溶解，再准确称取 5g TBA 于 TCA 溶液中，加热搅拌，待完全溶解后转移到 1000ml 容量瓶中定容到刻度，置于棕色瓶中 4℃冰箱保存。

丙二醛含量的测定：量取反应液 2ml 于 10ml 离心管中，加入 2ml 上述所提取的粗酶液，盖上塞子混匀，煮沸 20min，迅速置于冰水中冷却，在 4℃下 10,621g 离心 20min，用反应液调 0，测定其在 450、532 和 600nm 下的光吸收值。用双组分光光度法计算样品提取液中 MDA 浓度。计算公式：MDA(μmol/L)=6.45×(OD_{532}-OD_{600}) -0.56 OD_{450}，根据 MDA 的浓度和所取样品的重量计算其含量（刘祖祺和张石城，1994）。

1.2 结果与分析

1.2.1 丙二醛（MDA）含量的变化

表 1 苎麻雄性不育系与保持系叶片丙二醛含量测定结果：（单位：μmol /g）

Table 1 Malondiadehyde content in leaves of ramie male-sterile lines and their corresponding maintainer lines

时期	SS370 (A1)	GS13-X_1 (B1)	GS14-1 (A2)	GS13-X_2 (B2)
营养生长期	0.0187	0.0145	0.0205	0.0154
现蕾初期	0.0162	0.0157	0.0183	0.011
壮蕾期	0.0249	0.0179	0.0252	0.0093
初花期	0.0256	0.0213	0.0218	0.0127
盛花期	0.0281	0.0224	0.0252	0.0132

A1, B1 为一组不育系与保持系，A2, B2 为另一组不育系与保持系。

从不同时期叶片中丙二醛含量（表 1）可以看出，苎麻雄性不育系 SS370 丙二醛含量在营养生长期到现蕾初期略有下降，壮蕾期后一直上升，保持系 GS13-X_1 总体呈平缓上升趋势；整体来看不育系叶片中丙二醛含量明显高于保持系。苎麻雄性不育系 GS14-1 丙二醛含量呈波动状，壮蕾期和盛花期最高，保持系 GS13-X_2 叶片中丙二醛含量在营养生长期到壮蕾期明显下降，初花期后又明显回升，各时期特别是

壮蕾期后不育系叶片中丙二醛含量远高于保持系。总体看来，2 组材料的丙二醛含量均是不育系高于保持系。

1.3 讨 论

大量研究表明，植物在逆境胁迫或衰老过程中，细胞内自由基代谢的平衡被破坏而有利于自由基的产生。过剩自由基的毒害之一是引发或加剧膜脂的过氧化作用，产生较多的膜脂过氧化产物，引起膜的完整性遭到破坏，造成细胞膜系统的损伤，严重时会导致植物细胞死亡；其次，自由基积累过多，也会使膜脂产生脱脂化作用，使磷脂游离，膜结构破坏，从而产生一系列生理生化紊乱，最终导致植物死亡（王宝山，1988；汪耀富等，1996）。

膜脂过氧化是在膜脂不饱和脂肪酸中发生的一系列自由基反应，其结果是降低膜中不饱和脂肪酸的含量。膜脂过氧化的中间产物自由基和最终产物丙二醛（MDA）都会严重地损伤生物膜的结构。膜脂过氧化对生物膜的损伤主要是膜中蛋白质的聚合和交联以及膜中类脂的变化引起的，质膜受到损伤后，其选择透性功能必将丧失，电解质和某些小分子有机物将大量渗漏。当 MDA 含量低于一定阈值时，细胞内电解质泄漏量的变化极小，而当植物体内 MDA 的含量增加到超过该阈值时，会引起细胞内电解质泄漏量的剧增，表现为相对电导率增加，此时植物叶片会呈现不可逆的伤害症状（刘祖祺和张石城，1994）。

本实验结果表明，在花蕾生长发育期间，两个苎麻雄性不育系叶片中的丙二醛（MDA）含量虽然在营养生长期到现蕾初期有所下降，但都比其保持系的高，因此使得细胞膜受损伤较大，引起细胞内电解质泄漏量的增加。这些变化可能会影响不育系雄性器官的发育，并最终导致雄性不育。

2 脯氨酸

氨基酸是氮同化的最初产物，是建造蛋白质的砖石。肖翊华等（1987）研究了光敏核不育水稻败育在不同人工条件下，花粉不同发育时期的游离氨基酸的变化。发现在所检测的 17 种游离氨基酸中，与花药败育密切相关的氨基酸为脯氨酸。脯氨酸是花粉中氨基酸的一种储藏形式，可以转变成谷氨酸等其他氨基酸。因而脯氨酸含量的降低，必然会影响到蛋白质的生物合成。脯氨酸在花粉中通常与含量丰富的碳水化合物相配合，具有提供营养、促进花粉发育、发芽和花粉管伸长的作用。本节将对苎麻雄性不育系及其对应保持系叶片中脯氨酸含量进行探讨。

2.1 材料与方法

2.1.1 材料

同第三章 1.1.1

2.1.2 方法

2.1.2.1 脯氨酸含量的测定（张志良，1990）

脯氨酸测定试剂的配制：称取2.5g茚三酮，加入冰醋酸54ml和6mol/L磷酸36ml，80℃搅拌至完全溶解，迅速冷却，4℃保存备用。

标准曲线的制作：准确称取0.01g LD-脯氨酸，先用少量酒精（25ml）溶解，然后用蒸馏水定容至100ml，得到浓度为100μg/ml的标准脯氨酸溶液。取11支10ml的试管，编号后依次加入：0、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.1、2.4、2.7、3.0ml的标准溶液和10、9.7、9.4、9.1、8.8、8.5、8.2、7.9、7.6、7.3、7.0ml的蒸馏水，混匀，即得到浓度分别为0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30μg/ml的标准脯氨酸溶液。取各浓度的标准溶液、冰醋酸和测定试剂各2ml，沸水浴煮15min，冷却后在515nm下测其吸光度值。以光吸收值作横坐标、脯氨酸浓度作纵坐标制作标准曲线。标准曲线回归方程为：$y=26.628x+1.8502$（脯氨酸浓度单位：μg/ml，符合系数：0.9974）。

脯氨酸含量测定：①取0.5g叶片，加入5ml无水乙醇研磨至匀浆，转入20ml刻度试管，加水至刻度处，于80℃水浴中加热20min，稍冷后分别加入约少量人造沸石和活性炭，摇匀，静置10min后过滤至三角瓶中。②取滤液、冰醋酸和测定试剂各2ml于10ml试管中，沸水浴中煮15min。待冷却后在515nm下测定其光吸收值。（另取一试管加入蒸馏水、冰醋酸和测定试剂各2ml，同时于沸水浴中煮15min，测定时作调零用）。

2.2 结果与分析

2.2.1 脯氨酸含量的变化

表2 苎麻雄性不育系与保持系叶片脯氨酸含量测定结果：（单位：μg/ml）

Table 2 Proline content in leaves of ramie male-sterile lines and corresponding maintainer lines

时期	SS370 (A1)	GS13-X_1 (B1)	GS14-1 (A2)	GS13-X_2 (B2)
营养生长期	0.2615	0.2734	0.3172	0.2890
现蕾初期	0.2805	0.3473	0.3342	0.3292
壮蕾期	0.3858	0.4101	0.3559	0.3719
初花期	0.5624	0.5953	0.3908	0.4157
盛花期	0.5213	0.6120	0.4332	0.4506

A1, B1为一组不育系与保持系，A2, B2为另一组不育系与保持系

从不同时期叶片中脯氨酸的含量（表 2）可以看出，苎麻雄性不育系 SS370 与其对应的保持系 GS13-X_1 叶片中脯氨酸含量在整个生长过程中总体呈上升趋势，不育系到盛花期时有所下降，不育系叶片中脯氨酸含量明显低于保持系；苎麻雄性不育系GS14-1 与其对应的保持系GS13-X_2叶片中脯氨酸含量在整个生长过程中呈上升趋势，前两个时期不育系叶片脯氨酸含量比保持系高，之后均低于保持系。

2.3 讨论

有关脯氨酸含量与植物雄性不育性的关系已作了大量研究，均发现在雄性不育系花药中脯氨酸含量降低或缺乏，在小麦、水稻、玉米、番茄、萝卜、辣椒等作物上都得到了相似的结果（Kaul，1988）。花药中积累的游离脯氨酸部分来自营养体，部分由花药内谷氨酸转化而来。不育系中游离脯氨酸含量的降低，必然会使花粉的正常发育受阻。

本研究结果表明，苎麻雄性不育系 SS370 中的脯氨酸含量一直低于对应保持系，苎麻雄性不育系 GS14-1 在营养生长期和现蕾初期比保持系的略高，但之后保持系中的脯氨酸含量上升，而不育系脯氨酸含量均低于其保持系，这与前人（刘忠松，1987；彭业芳和王永锐，1991；夏涛和刘纪麟，1993；孙日飞等，2000；张丽等，2002）的结果完全一致。朱广廉等（1985）认为，不育系花器官中游离脯氨酸含量减少的可能原因，一是由营养体以主动方式向花器官的脯氨酸运输发生障碍；二是不育系脯氨酸合成能力减弱。因此认为，不育系中的脯氨酸含量低于保持系，可能是不育系本身合成脯氨酸能力较差造成的，并非由于营养体向花器官运输发生障碍所致。

3 细胞膜脂过氧化防御酶

植物体内多余的活性氧主要通过有关的酶类或活性氧清除剂（非酶类）来清除，生物体内广泛存在能清除活性氧代谢的保护酶类，它们把活性氧转变为低活性物质，从而保护膜系统，使细胞膜脂过氧化减轻。这些酶类有超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、过氧化物酶（peroxidase, POD）、过氧化氢酶（catalase, CAT）等。植物活性氧清除剂主要有类胡萝卜素、抗坏血酸（AsA）、还原型谷胱苷肽（GSH）、维生素 E、甘露醇和生物碱等。正常情况下，细胞内自由基的产生与清除处于一种动态平衡。但是，植物体在逆境胁迫下，或是由于植物体自身内部的原因（如基因突变或核质遗传物质不协调等引起的雄性不育），常会产生过多的活性氧，从而对细胞膜系统造成伤害。

超氧化物歧化酶（SOD）的主要功能是清除生物体内超氧离子基团，使生物体内过多的活性氧转变为过氧化氢，过氧化物酶（POD）和过氧化氢酶（CAT）能清除植物体内产生的有毒过氧化氢。作为生物体内主要的活性氧防御酶，SOD、POD

和 CAT 协同维持体内的活性氧代谢平衡，保护生物膜结构。但当植物体内的活性氧含量在某一时期或某一组织大量产生时，SOD、POD 和 CAT 活性就会产生对应的变化。

苎麻雄性不育系在花蕾生长发育期间，细胞膜脂过氧化增强，积累较多的丙二醛，细胞膜受损伤较大，细胞内电解质外渗量增多。苎麻体内活性氧防御酶的状况到底怎样，本节将作一些初步的探讨。

3.1 材料与方法

3.1.1 材料

同第三章 1.1.1

3.1.2 方法

3.1.2.1 提取液的配制和粗酶液的提取

同第三章 1.1.2.1

3.1.2.2 NBT 光还原法测定 SOD 活性

贮备液的配制：贮备液 A：0.2mol/L 三羟甲基氨基甲烷（24.2g 三羟甲基氨基甲烷溶于蒸馏水中，定容到 1000ml）。贮备液 B：0.2mol/L 盐酸（浓盐酸 17.1ml 用水稀释，容量瓶定容到 1000ml）。

反应液的配制：先配制 50mmol/L Tris-HCl（pH7.8）缓冲液：250ml 贮备液 A 与 162.5ml 贮备液 B 混合，调节 pH 至 7.8，1000ml 容量瓶中加蒸馏水定容到刻度。再在其中溶解 0.0818g 氯化硝基四氮唑蓝（100μmol/L NBT）、0.0372g 乙二胺四乙酸二钠（0.1mmol/L EDTA-Na_2）和 1.9949g DL- 甲硫氨酸（13.37mmol/L 蛋氨酸）。

核黄素的配制：先配制 50mmol/L Tris-HCl（pH7.8）缓冲液。250ml 贮备液 A 与 162.5 ml 贮备液 B 混合，调节 pH 至 7.8，1000ml 容量瓶中加蒸馏水定容至刻度。然后称取 0.0372g EDTA-Na_2 （0.1mmol/L）和 0.0376g 核黄素（0.1mmol/L）溶于所配制的缓冲液中。

SOD 活性测定：黑暗中（微光环境，暗室中）取 3.8ml 反应液和 150μl 核黄素溶液到 φ1cm×10cm 的小试管中，加入适量粗酶液（20μl 左右）混匀；同时用不加粗酶液的试管作为最大光还原管。将试管竖置于试管架中，其中试管架两边和正中间都放置最大光还原管。在 6000lx 光强下照光 15min，迅速遮光并在 560nm 下暗中测定各管光吸收值（OD 值）（用反应液调零），调节酶量使其抑制 NBT 光化还原为最大光还原值的 50%左右，以抑制 NBT 光化还原 50%所需要的酶量为一个 SOD 酶活力单位（u）。计算公式：（OD_{max}-OD）/（OD_{max}×50%）。最后用蛋白质含量表示 SOD 酶活性的大小（单位：u/mg protein）（Giannopolitis and Ries，1977）。

3.1.2.3 愈创木酚法测定 POD 活性

反应液的配制：临时配制 50mmol/L Tris-HCl (pH7.0)缓冲液 200ml，量取愈创木酚 112μl，在 70℃下搅拌直至完全溶解，待溶液冷却后加入 30%过氧化氢 76μl，混合均匀，保存在冰箱中随即测定。

POD 活性测定：取 3ml 反应液于比色杯中，用移液枪加入粗酶液 100μl，迅速用移液枪混合均匀，测定其在 470nm 波长下光吸收值的变化情况，在 30s 内每隔 5s 测定一次光吸收（OD）值大小，用反应液调零，以每分钟 OD 值增加 0.01 为一个酶活力单位（u），计算公式为：（OD_{30S}-OD_{0S}）×2/0.01。最后用蛋白质含量表示 POD 酶活性大小（单位：u/mg protein）（刘祖祺和张石城，1994）。

3.1.2.4 紫外分光光度法测定过氧化氢酶（CAT）活性

反应液的配制：临时配制 50mmol/L Tris-HCl (pH7.8)缓冲液，其中含 10 mmol/L H_2O_2。

CAT 活性测定：3ml 反应液中加入 10μl 酶液，在 240nm 下测定每分钟吸收值的减少，一个酶活性单位（u）为每分钟吸收减少 0.01OD 值（赵会杰等，1996b），计算公式为：（OD_{60S}-OD_{0S}）/0.01。最后用蛋白质含量表示 CAT 酶活性大小（单位：u/mg protein）。

3.2 结果与分析

3.2.1 超氧化物歧化酶（SOD）活性的变化

表 3　苎麻雄性不育系与保持系叶片 SOD 活性测定结果：（单位：u/mg protein）

Table 3 Superoxide dismutase（SOD）activity in leaves of ramie male-sterile lines and corresponding maintainer lines

时期	SS370 (A1)	GS13-X_1 (B1)	GS14-1 (A2)	GS13-X_2 (B2)
营养生长期	29.59	30.18	36.86	28.77
现蕾初期	36.49	32.68	30.34	30.37
壮蕾期	30.75	27.52	28.25	26.85
初花期	31.45	28.65	30.27	29.35
盛花期	35.72	31.48	29.32	30.11

A1, B1 为一组不育系与保持系，A2, B2 为另一组不育系与保持系

从不同时期叶片中 SOD 活性（表 3）可以看出，苎麻雄性不育系 SS370 与其对应的保持系 GS13-X_1 叶片中 SOD 活性在整个生长过程中呈上升-下降-上升的趋势，现蕾初期最高；不育系叶片中 SOD 活性稍稍高于保持系。苎麻雄性不育系 GS14-1

的 SOD 活性在营养生长期稍高，保持系 GS13-X_2 叶片中 SOD 活性也呈上升-下降-上升的趋势，不育系叶片 SOD 活性只在盛花期稍低于保持系，其他时期比保持系稍高。总体上看，2 组材料均是不育系的 SOD 活性高于保持系。

3.2.2 过氧化物酶（POD）活性的变化

表 4 苎麻雄性不育系与保持系叶片 pod 活性测定结果：（单位：u/mg protein）

Table 4 Peroxidase（POD）activity in leaves of ramie male-sterile lines and corresponding maintainer lines

时期	SS370 (A1)	GS13-X_1 (B1)	GS14-1 (A2)	GS13-X_2 (B2)
营养生长期	7.12	10.76	6.14	4.34
现蕾初期	4.34	7.31	4.83	3.66
壮蕾期	5.85	12.95	8.3	6.25
初花期	10.75	15.37	11.57	5.2
盛花期	17.3	19.15	15.86	8.38

A1, B1 为一组不育系与保持系，A2, B2 为另一组不育系与保持系

从不同时期叶片中 POD 活性（表 4）可以看出，苎麻雄性不育系 SS370 与保持系叶 GS13-X_1 片中 POD 活性在营养生长期到现蕾初期呈下降趋势，之后呈上升趋势，至盛花期最高；不育系叶片中 POD 活性均低于保持系。苎麻雄性不育系 GS14-1 的 POD 活性类似于前一组，保持系叶片中 POD 活性上下波动，规律性较差，不育系叶片 POD 活性高于保持系。

3.2.3 过氧化氢酶（CAT）活性的变化

表 5 苎麻雄性不育系与保持系叶片 CAT 活性测定结果：（单位：u/mg protein）

Table 5 Catalase（CAT）activity in leaves of ramie male-sterile lines and corresponding maintainer lines

时期	SS370 (A1)	GS13-X_1 (B1)	GS14-1 (A2)	GS13-X_2 (B2)
营养生长期	68.70	67.24	49.57	57.39
现蕾初期	65.22	66.52	51.62	61.31
壮蕾期	76.09	78.26	55.34	70.87
初花期	88.26	92.17	70.43	89.13
盛花期	103.5	106.47	78.26	96.09

A1, B1 为一组不育系与保持系，A2, B2 为另一组不育系与保持系

从不同时期叶片中 CAT 活性（表 4）可以看出，芝麻雄性不育系 SS370 和保持系 GS13-X_1 叶片中 CAT 活性在营养生长期和现蕾初期变化都趋于缓慢下降，之后呈上升趋势；不育系叶片中 CAT 活性低于保持系。芝麻雄性不育系 GS14-1 和保持系 GS13-X_2 的 CAT 活性变化呈缓慢上升趋势，各时期 CAT 活性都是不育系低于保持系。

3.3 讨论

前人对植物雄性不育材料 SOD、POD 和 CAT 活性作了大量的研究。绝大部分对 SOD 的研究结论是：在雄性不育系中 SOD 的活性比其保持系的低（陈贤丰和梁承邺，1991；段俊等，1996；赵会杰等，1996b；），但有些研究结果表明，雄性不育系中的 SOD 活性比其保持系的高（张学昆等，2000；张建奎等，2001；余玲等，2003）。对 POD 的研究结论也不一致，有些认为雄性不育系中的 POD 活性比其保持系的高（黄厚哲，1984；耿三省等，1997；赵前程等，2002），有些认为雄性不育系中的 POD 活性比其保持系的低（陈贤丰和梁承邺，1991；张明永等，1997；赵会杰等，1996b）。对 CAT 的研究结果较为一致，即雄性不育系中的 CAT 活性都比其保持系的低（赵会杰等，1996b；耿三省等，1997）；这方面的研究仅有少数例外（张学昆等，2000；侯建华等，2003）。

3.3.1 SOD 活性与芝麻雄性不育性

本研究对芝麻雄性不育系 SOD 活性的测定结果表明，2 个芝麻雄性不育系叶片中的 SOD 活性大多数情况下比其对应的保持系高，这与多数同类研究结果不一样，类似的结果仅见张建奎等（2001）和余玲等（2003）的报道。一般认为，雄性不育系在败育过程中，SOD 活性比保持系的低，不能有效地清除体内过多的活性氧，导致细胞膜受到伤害，引起雄性不育。但是，也有研究表明，SOD 是一种诱导酶，它既可被 O^-_2 诱导而提高活性，又能催化体内 O^-_2 的歧化反应而形成氧分子和过氧化氢（李向东等，2001）。

本研究中的 2 个芝麻雄性不育系叶片中的丙二醛含量都比保持系的高，说明膜脂过氧化比较严重，进而说明过氧化氢含量较高，这可能是诱导不育系花蕾 SOD 活性较高的直接原因。因此，可以确定芝麻叶片中的 SOD 活性与雄性不育性有关联。

3.3.2 POD 活性与芝麻雄性不育性

过氧化物酶（POD）作为植物细胞内重要的组成成分，具有许多非常重要的生理功能，如参与活性氧代谢过程；参与木质素和木栓质的合成；参与生长素的降解；参与其它物质的氧化过程；除了与植物正常代谢和生长发育相关的结构型 POD 外，很大部分 POD 的合成属于诱导表达型，这已为大量的胁迫处理试验和分子水平上的基因调控研究证据所证实（田国忠等，2001）。李伶俐等（2001）在对棉花幼铃脱落机制的研究时推测棉花即将脱落幼铃在开花后产生了较多的 O^-_2，作为应激反应，幼

铃中 SOD 活性也对应提高，歧化 O^{-}_{2} 产生较多的过氧化氢又诱导 POD 活性提高。

本研究对苎麻雄性不育系 POD 活性的测定结果表明，苎麻雄性不育系 GS14-1 叶片中的 POD 活性都比其对应的保持系高，这可能是由于苎麻雄性不育系叶片中产生了较多的过氧化氢，诱导 POD 活性的提高。但是，苎麻雄性不育系 SS370 叶片中的 POD 活性又比其对应的保持系低，这可能是由于苎麻雄性不育系 SS370 败育发生较早，致使其呼吸作用强度低于对应的保持系，因此过氧化氢产生量比对应的保持系少所致。看来苎麻叶片中 POD 活性与其雄性不育的关系还有待进一步研究。

3.3.3 CAT 活性与苎麻雄性不育性

过氧化氢酶主要存在于植物过氧化物酶体与乙醛酸循环体中，它与抗坏血酸过氧化物酶（AsA-POD）一样都是清除过氧化氢的主要酶类，不同之处在于：前者不需要还原力且具有较高的酶活速率，但对过氧化氢的亲和力较弱，后者需要还原性底物，并对过氧化氢具有较高的亲和力。已有的研究表明，过氧化氢酶是 C_3 植物中过氧化氢清除的关键酶，而且是 C_3 植物耐受胁迫所必需的（Willekens 等，1994）。可见，过氧化氢酶（CAT）与植物体内的过氧化氢代谢有关，并能减轻过氧化氢对植物的损伤。本研究中 2 个苎麻雄性不育系叶片中的 CAT 活性都比其对应的保持系低，这可能会影响到不育系中的过氧化氢不能及时分解，造成对细胞膜的伤害，从而导致不育。

4 蛋白质

蛋白质是基因表达的最终产物，控制植物体的性状。由于雄性不育植物中 DNA 和 RNA 的变化，必然会导致蛋白质变化。蛋白质对小孢子的发育极为重要，不仅可为植物的生命活动提供能量和为其它物质的合成提供中间产物，又是细胞的重要组成部分，可溶性蛋白质中包含了各种酶原、酶分子和代谢调节物，在花药和小孢子的发育过程中具有决定意义。本节将对苎麻雄性不育系及其保持系的蛋白质含量进行比较，并探讨它们与苎麻雄性不育性的关系。

4.1 材料与方法

4.1.1 材料

同第三章 1.1.1

4.1.2 方法

4.1.2.1 提取液的配制和粗酶液的提取

同第三章 1.1.2.1

4.1.2.2 考马斯亮蓝（G-250）法测定蛋白质含量

蛋白质测定试剂的配制：配制 0.01%考马斯亮蓝 G-250、4.7%的乙醇和 8.5%的

磷酸（w/v）。称取考马斯亮蓝 0.1g，量取 95%乙醇 47ml 和磷酸 85ml，混合后溶于适量水中，搅拌至完全溶解，转移至 1000ml 容量瓶中定容到刻度。静置一夜，次日过滤后盛装于棕色瓶中，4℃下冰箱中保存备用。

标准曲线的制作：称取 0.100g 牛血清蛋白，溶解于 80ml 左右水中，50℃加热并搅拌直至完全溶解。把溶解后的牛血清蛋白溶液转入 100ml 容量瓶中，加水至刻度，混匀即得 1mg/ml（即 1000μg/ml）标准牛血清蛋白。取 11 根试管，分别在其中加入 1mg/ml 牛血清蛋白溶液 0、20、40、60、80、100、120、140、160、180、200μl 和蒸馏水 200、180、160、140、120、100、80、60、40、20、0μl，再加入考马斯亮蓝溶液 10ml，在 595nm 下测定各自的光吸收值。以光吸收值作横坐标、蛋白质浓度作纵坐标制作标准曲线。标准曲线回归方程为：y = 37.128x -0.1628（蛋白质浓度单位：μg/ml，符合系数：0.9962）。

蛋白质含量的测定：在小试管中加入前面所提取的粗酶液 200μl，然后加入蛋白质测定试剂 10ml，迅速混匀，在 2～60min 内测定其在 595nm 下的光吸收值。根据标蛋白质准曲线计算蛋白质的含量。

4.2 结果与分析

4.2.1 蛋白质含量的变化

表 6　苎麻雄性不育系与保持系叶片蛋白质含量测定结果：（单位：μg/ml）

Table 6 Protein content in leaves of ramie male-sterile lines and corresponding maintainer lines

时期	SS370 (A1)	GS13-X_1 (B1)	GS14-1 (A2)	GS13-X_2 (B2)
营养生长期	11.43	11.95	10.10	11.18
现蕾初期	11.59	12.16	8.19	9.59
壮蕾期	11.75	12.67	8.90	10.01
初花期	12.90	14.13	12.28	13.21
盛花期	15.30	16.37	13.02	15.14

A1, B1 为一组不育系与保持系，A2, B2 为另一组不育系与保持系

从不同时期叶片中蛋白质的含量（表 6）可以看出，苎麻雄性不育系 SS370 与其对应的保持系 GS13-X_1 叶片中的可溶性蛋白质含量整体呈上升趋势，不育系叶片中蛋白质含量低于保持系；苎麻雄性不育系 GS14-1 与其对应的保持系 GS13-X_2 叶片中的可溶性蛋白质含量在营养生长期到现蕾初期下降，之后又明显回升，各时期不育系叶片中蛋白质含量低于保持系。

4.3 讨论

4.3.1 蛋白质含量与芝麻雄性不育

蛋白质是基因表达的最终产物，引起雄性不育的基因转录成 mRNA 后要翻译成蛋白质才能发挥作用。一般说来，雄性不育系的蛋白质含量低于可育系。王亚馥等（1984）对大白菜胞质雄性不育株和可育株花苞蛋白质的电泳分析表明，可育株的蛋白质种类明显多于不育株。大白菜 6 个雄性不育“两用系”、一个雄性不育系均表现为不育株较可育株的蛋白质含量低（王淑华等，1998）；灯笼红萝卜雄性不育株中可溶性蛋白及游离脯氨酸含量都低于可育株（魏毓棠，2001）。

本研究结果也表明，各时期雄性不育芝麻中的蛋白质含量都比其对应保持系低，而且随着花蕾的发育，这种差距还有扩大的趋势，表明叶片中蛋白质含量与雄性不育性有直接关系。

小　结

通过切片观察发现，虽然两个保持系 GS13-X_1 和 GS13-X_2 雄蕊和小孢子发育特征相同，但其对应不育系 SS370 和 GS14-1 的雄性败育特征却各不相同。SS370 的雄性败育发生更早，败育更彻底，在雄花花序分化期便出现败育；GS14-1 的雄性败育发生稍晚，多在雄花被形成后雌雄蕊原基分化期发生败育，因而通过解剖能看到雄蕊原基的各种异常情况。同其它双子叶比较，苎麻雄性不育系的不育特征表现得更早，其遗传学和生理学机理值得进一步研究。

在花蕾生长发育期间，不育系叶片中丙二醛含量比保持系更高，暗示着细胞膜受损伤较大，引起细胞内电解质泄漏量的增加，这可能会影响不育系雄性器官的发育，并最终导致雄性不育。

苎麻雄性不育系 SS370 叶片的脯氨酸含量在各个时期中都低于对应的保持系；GS14-1 在营养生长期和现蕾初期的脯氨酸含量比对应保持系略高，但之后不育系脯氨酸含量均低于保持系。我们认为，不育系中的脯氨酸含量低于保持系，可能是不育系本身合成脯氨酸能力较差造成的，并非由于营养体向花器官运输发生障碍所致。

SOD 活性和 CAT 活性在 2 组材料中表现为一致性的规律：2 个苎麻雄性不育系叶片中的 SOD 活性都比对应保持系的高，2 个不育系 CAT 活性都比对应保持系的低。由于 2 个苎麻雄性不育系叶片中的丙二醛含量都比保持系的高，膜脂过氧化比较严重，过氧化氢含量较高，这可能是诱导不育系花蕾 SOD 活性较高的直接原因。2 个苎麻雄性不育系叶片中的 CAT 活性都比其对应的保持系低，这可能会影响到不育系中的过氧化氢不能及时分解，从而造成对细胞膜的伤害，导致不育。

POD 活性表现不太一致：SS370 比其保持系 GS13-X_1 更低，可能是由于 SS370 败育发生较早，呼吸作用强度低于对应的保持系，因此过氧化氢产生量比对应的保持系少所致；而 GS14-1 比其保持系 GS13-X_2 更高，这可能是由于苎麻雄性不育系叶片中产生了较多的过氧化氢，诱导 POD 活性的提高。

2 个雄性不育系的蛋白质含量在各时期都比其对应保持系更低，而且随着花蕾的发育，这种差距还有扩大的趋势，说明叶片中蛋白质含量与雄性不育性可能有直接关系。

上述研究结果表明，2 个苎麻不育系雄性败育的细胞学特征各有差异，丙二醛和脯氨酸含量、抗氧化酶如 SOD、POD 和 CAT 的活性，以及蛋白质代谢的变化，可能影响苎麻不育系雄性器官的发育，最终导致雄性不育。

参 考 文 献

白书农. 植物发育生物学. 北京: 北京大学出版社, 2003

陈贤丰, 梁承邺. HPGMR 农垦 58S 不同育性花药能量代谢比较研究.见:袁隆平主编.两系法杂交水稻研究论文集.农业出版社, 1992b , 182-185

陈贤丰, 梁承邺. 水稻不育花药中 H_2O_2 的积累与膜脂过氧化的加剧. 植物生理学报, 1991, 17(1): 44-48

丁德荣, 盖钧镒等.大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 花粉败育的细胞学研究.大豆科学, 2001, 20(3) :167-171

董庆华, 利容千, 王建波. 菜薹细胞质不育系小孢子发生的细胞形态学研究. 园艺学报, 1997, 24(2): 150-154

段　俊, 梁承邺, 张明永. 玉米细胞质雄性不育与膜脂过氧化的关系. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 331-334

耿三省, 毛爱军, 蒋键箴. 辣椒雄性不育花药的生化特性. 北京农业科学, 1997, 15(2): 26-27

耿三省, 王志源, 蒋键箴, 等. 辣椒雄性不育系小孢子发生的细胞学观察. 园艺学报, 1994, 21(2): 165-169

韩爱华, 尹克林, 宋来庆, 等.新梨 7 号雄性不育特性及其败育的细胞学研究.西南农业大学学报(自然科学版) , 2004 , (1): 64-67

韩玉珠, 栗长兰, 张汉卿. 大白菜细胞质雄性不育系及保持系的花药发育. 吉林农业大学学报, 1999, 21(1): 52-55

何之常. HPGMR 农垦 58S 光敏感期阳离子过氧化物酶的变化.武汉植物学研究, 1995 , 13(2) :157-162

侯建华, 田自华, 贺学勤, 等. 甜菜胞质雄性不育系与保持系某些生理特性的差异. 华北农学报, 2003, 18(3): 32-35

黄厚哲, 楼士林, 王侯聪, 等. 植物生长素亏损与雄性不育的发生. 厦门大学学报(自然科学版), 1984, 23(1): 82-97

江　勇, 王明全. 珍汕97不育系和保持系水稻花粉发育过程中RNA含量变化的研究.武汉大学学报(自然科学版) , 1997 , 43(6) :763-766

李伶俐, 杨青华, 李　文. 棉花幼铃脱落过程中 IAA、ABA、MDA 含量及 SOD、POD 活性的变化. 植物生理学报, 2001, 27(3): 215-220

李向东, 王晓云, 张高英, 等. 花生叶片衰老过程中某些酶活性的变化. 植物生理学报, 2001, 27(4): 353-358

林桂芳, 梁承邺, 孙谷畴. 雄行不育水稻小孢子败育与花药的有机自由基水平.植物学报, 1993 , 35(3) :215-221

刘春光, 吴郁文, 张翠兰, 等. 小麦D2型细胞质雄性不育系雄配子发育的细胞形态学特征和同工酶的研究. 遗传学报, 1995, 22(3): 199-205

刘飞虎, 梁雪妮, 张寿文, 等. 苎麻雄性不育系育性鉴定和遗传分析.中国麻作, 2000a , 22(1) :6-9

刘飞虎, 梁雪妮, 张寿文, 等. 苎麻雄性不育系温光反应特性研究研究.江西农业大学学报, 2000b , 22(3) :20-23

刘飞虎, 梁雪妮. 苎麻雄性不育系生理生化特点初步研究.中国麻作, 2000c , 22(3) :16-20

刘金兰, 聂以春, 黄观武, 等. 棉花洞 A 型核雄性不育材料花粉发育的细胞形态学观察. 棉花学报, 1994, 6(2): 70-43

刘忠松, 官春云, 陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用. 北京: 中国农业出版社, 2001

刘忠松. 不育花药的生理生化研究进展与展望. 植物生理学通讯, 1987, 2: 16-21

刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学. 北京: 中国农业出版社, 1994

彭业芳, 王永锐. 光敏核不育水稻花粉败育中淀粉和蛋白质含量的研究. 中山大学学报, (自然科学版), 1991, 30(4):92-99

裘泰辰. 作物雄性不育性育种原理与方法. 上海: 上海科学技术出版社, 1978

粟翼玟, 赵双宜, 张燕君,等. 萝卜雄性不育系小孢子发生的细胞形态学研究. 园艺学报, 1995, 22(4): 348-352

孙日飞, 方智远, 张淑江, 等. 萝卜胞质大白菜雄性不育系的生化分析. 园艺学报, 2000, 27(3): 187-192

曰国忠, 李怀芳, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展. 武汉植物学研究, 2001, 19(4): 332-344

汪怀建, 刘飞虎, 梁雪妮, 等. 苎麻雄性不育系的感光感温类型初探.安徽农业科学, 2000 , 28(2) :132-133

汪耀富, 韩锦峰, 林学梧. 烤烟生长前期对干旱胁迫的生理生化影响研究. 作物学报, 1996, 22(1): 117-122

王 台,童 哲.光周期敏感核不育水稻农垦 S58 败育花粉的显微结构变化.作物学报, 1992 , 18(2) :132-136

王 台,肖翊华,刘文芳.光敏核不育水稻育性诱导和转换过程中叶片内碳水化合物的变化.作物学报, 1991 , 7(5) :369-375

王宝山. 生物自由基与植物膜伤害. 植物生理学通讯, 1988, 2: 12-16

王淑华, 魏毓棠, 冯 辉, 等. 大白菜雄性不育株与可育株花蕾生理生化特性比较分析. 沈阳农业大学学报, 1998, 29(2): 132-137

王学德, 张天真, 潘家驹. 细胞质雄性不育棉花小孢子发生的细胞学观察和线粒体DNA 的RAPD 分析. 中国农业科学, 1998, 31(2): 70-75

王亚馥, 胡昌勤, 安旺盛, 大白菜雄性可育株与雄性不育株花苞的核酸、蛋由质、酶的初步分析. 兰州大学学报(自然科学版), 1984, 20(1): 90-96

魏毓棠, 张　丽, 张大昕, 等. 萝卜雄性不育小孢子发育过程中物质代谢的研究. 辽宁农业科学, 2001(4): 8-10

夏　涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育的细胞学研究. 作物学报, 1989, 15(2):97-103

夏　涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育系物质代谢系统的研究. 华中农业大学学报, 1993. 12: 1-6

夏　涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育系组织抗氰呼吸关系的研究.中国农业科学. 1988 , 21(5) :39-43

肖翊华主编.光敏核不育水稻花药败育过程中游离氨基酸的比较分析.武汉大学大学学报(自然科学版) , 1987(HPGMR 专刊) , 95-100

徐树华.同核异质水稻雄性不育系花粉和花药发育的细胞形态学观察.作物学报, 1980 , 6(4) :225-230

杨金水, Virginia Walbot.水稻野败不育系与保持系的线粒体 DNA 限制性酶切图谱分析.作物学报, 1995 , 21(2) :181-187

余　玲, 丁　勤, 马翎健, 等. 1B-1R与非 1B-1R类型小麦雄性不育系 SOD 活性比较研究. 宁夏农学院学报, 2003, 24(2): 1-27

袁亦楠. 番茄雄性不育突变体小孢子发育的细胞学研究.华北农学报, 2000 , 15(3) :61-65

张　丽, 李胄燕, 魏毓棠, 等.萝卜雄性不育小孢子发育过程中物质代谢的研究. 安徽农业科学, 2002, 30(3): 326-327

张成合, 刘世雄, 申书兴, 等. 核不育大白菜花粉败育观察初报. 河北农业大学学报, 1993, 16(4): 9-13

张建奎, 宗学凤, 王俊义. 等. 浒光敏核雄性不育小麦花药中保护酶活性的变化. 麦类作物学报, 2001, 21(4): 26-30

张明永, 梁承邺, 段　俊, 等. CMS 水稻不同器官的膜脂过氧化水平. 作物学报, 1997, 23(5): 603-606

张天真, 潘家驹. 陆地棉473A 核雄性不育系小孢子败育的细胞学研究. 南京农业大学学报, 1991, 14(3): 7-11

张学昆, 李加纳, 唐章林, 等. 油菜双重不育系活性氧清除酶的特点. 中国油料作物学报, 2000, 22(2): 14-17

张志良主编. 植物生理学实验指导（第二版）. 北京: 高等教育出版社, 1990

赵会杰, 刘华山, 林学梧, 等. 小麦胞质不育系花药中脂氧合酶及抗坏血酸过氧化物酶活性的变化. 植物生理学通讯, 1996a, 32 (5): 344-346

赵会杰, 刘华山, 林学梧, 等. 小麦胞质不育系花粉败育与活性氧代谢关系的研究. 作物学报, 1996b, 22 (3): 365-367

赵会杰, 毛凤梧, 刘华山,等. 小麦胞质不育系花粉败育的生理机制研究. 见: 吴　丁, 卢翠乔主编, 《植物生理学与跨世纪农业研究》, 科学出版社, 1999: 313-317

赵前程, 耿　育, 陈雪平, 等. 花椰菜雄性不育系小孢子发育过程及其 POD 活性. 华北农学报, 2002, 17(2): 108-111

朱广廉, 孙　超, 曹宗巽. 太谷核不育小麦可育花药内游离脯氨酸的来源、利用及与不育花药败育的关系. 植物生理学报, 1985, 11: 122-129

朱英国.水稻不同细胞质类型雄性不育的研究.作物学报, 1979 , 5(4) :29-38

朱英国主编. 水稻雄性不育生物学. 武昌: 武汉大学出版社, 2000

Heslop-Harrison J. Features of male sterility in angiosperm. In: Sutherland J I and Falasca R J (eds), Proc. 26th Ammual Corn and Sorghum Resea Conf., Am. Seed. Trade. Assoc., 14-21

Kaul M L H. Male sterility in higher plants. Berlin: Spknger-Verlag, 1988

Laser K D and Lersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot. Rev.* 1972, 38: 427-454

Musgrave M E,Antonovics J,Siedow J N. Is male-sterility in plants related to lack of cyanide-resistant respiration in tissues? *Plant Sci.*, 1986, 44:7-11

Willekens H, Langebartels C, Tire C, et al. Differential expression of catalase genes in Nicotiana plunbaginifolia., *Proc. Natl. Acad. Sic. USA*, 1994, 91:10450-10454

致　谢

本文是在导师刘飞虎教授的精心指导下完成的。从论文的选题、实验设计、材料的繁殖到整个研究的诸多环节以及论文的修改，都倾注了刘老师无数的心血。刘老师博大的胸怀、谦虚仁厚的为人之道、渊博的学识及严谨的治学态度对我影响至深，并将让我受益终生。

本文的细胞形态学部分是在王跃华教授实验室和丁开宇副教授实验室完成的，衷心感谢两位教授给予的宝贵建议；同时，在实验操作方面还得到了马明霞、申仕康、张蕴等同学的帮助，一并表示感谢。

衷心感谢侯思名、黄海泉、杨正安、李飞、丁小维、肖伏、杨建兵、吴丽艳、范志祥、杜光辉、李建勇、段继强、王辉、刘璇、唐爱平、赖月群等同门师兄弟姐妹，他（她）们不但在学习和工作上给予了很多帮助，生活上也关照甚多，有在这样一个团结友爱的集体中生活的一段经历，真是一件难忘的事。

诚挚地感谢师母梁雪妮老师几年来对我生活和学习上的关心与爱护；感谢爷爷奶奶在材料培育和处理等工作中的付出与辛劳。

感谢我的父亲和母亲长期以来不断给予我的支持与鼓励，使我能全心身地投入到完成学业之中。

还有许多曾经帮助和支持过我而未提及姓名的老师、同学和朋友们，在此一并对你们致以诚挚的感谢，谢谢大家！

感谢中国国家自然科学基金《苎麻雄性不育相关基因的克隆和表达分析，30360058》对本项目所提供的支持。

杜 威

2007 年 5 月