

研究  
简报

## 几个甘蓝型油菜雄性不育系花药败育过程中核糖核酸酶的变化

聂明建<sup>1,2</sup> 王国槐<sup>1</sup> 陈光尧<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128; <sup>2</sup> 常德市农业科学研究所, 湖南常德 415000)

**摘要:** 以 5 种不同类型甘蓝型油菜雄性不育系为材料, 以保持系为对照, 对其花药败育过程进行了研究, 发现其败育过程中核糖核酸酶活力及游离尿苷酸(UMP)含量显著升高, 而 RNA 及可溶性蛋白质含量显著下降。不育系雄蕊的核糖核酸酶活力与 RNA 含量呈负直线相关, 相关系数为  $-0.9796^{**}$ 。认为核糖核酸酶活力异常增强与甘蓝型油菜雄性不育有密切关系。

**关键词:** 油菜; 雄性不育; 核糖核酸酶活力; 可溶性蛋白质; RNA 含量; 游离 UMP

中图分类号: S565

## Changes of RNase Vitality in the Anther Abortion Processes of Several Male Sterile Lines in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

NIE Ming-Jian<sup>1,2</sup>, WANG Guo-Huai<sup>1</sup> and CHEN Guang-Yao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> School of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan; <sup>2</sup> Changde Agricultural Science Research Center, Changde 415000, Hunan, China)

**Abstract:** The anther abortion processes of five different types of male sterile lines in Rapeseed (*Brassica napus* L.) are studied by contrast. The results show that the RNase vitality and the amount of free UMP of the male sterile lines increase greatly and the amount of RNA and soluble protein decrease obviously in the process of abortion. The relative coefficient between RNase vitality and the amount of RNA, which are negatively linearly related, is  $-0.9796^{**}$ . Therefore the abnormal increase of RNase vitality is closely related with the male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.).

**Key words:** Rapeseed (*Brassica napus* L.); Male sterile lines; RNase vitality; Soluble protein; the amount of RNA and free UMP

近年来,核糖核酸酶与植物雄性不育花药败育的关系受到人们的广泛关注。众所周知,现有的甘蓝型油菜工程雄性不育系中,被人工导入的 *barnase* 雄性不育基因就是从解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus anyloliquefaciens*)中提取出的核糖核酸酶基因<sup>[1,2]</sup>。既然人工导入的核糖核酸酶基因可以使正常油菜产生雄性不育,现有的甘蓝型油菜雄性不育系中核糖核酸酶是否异常,它与雄性不育的关系如何? 本文对此进行了研究。

### 1 材料与与方法

#### 1.1 材料

细胞质雄性不育系 392A、保持系 392B,显性两系核不育系 629AB 及隐性两系核不育系 86AB 由湖南省农业科学院陈卫江提供。为叙述方便,分别将从 629AB 及 86AB 中分离出的不育株称 629A 和 86A,可育株称 629B 和 86B。杀雄剂、转

基因雄性不育系湘油 15A 及对照湘油 15 由湖南农业大学陈社员提供。392B 现蕾后,喷化学杀雄剂产生的雄性不育植株称 392BS。

#### 1.2 方法

1.2.1 材料培育 2003 年 9 月 25 日将上述材料播于湖南农业大学试验田,播前每公顷底施 N、P、K 含量均为 16% 的复合肥 750 kg、菜饼 750 kg 及硼砂 15 kg。三叶期定苗,其他管理与一般大田相同。各品种于 2004 年 1 月 6 ~ 20 日陆续现蕾,2 月 15 ~ 20 日初花。

1.2.2 取样 在初花期,随机取 3 ~ 5 株可育及不育株油菜主花序及上部 3 ~ 4 个分枝,用游标卡尺准确测量花蕾大小,然后分别取长度  $\leq 1$  mm、1.5 mm、3 mm、5 mm 及 7 mm 的花蕾,用解剖针小心剥蕾取雄蕊,测定核糖核酸酶活力与可溶性蛋白质含量。取 1 mm、3 mm、5 mm 及 7 mm 的花蕾,测定

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(OOJJY 1005)。

作者简介: 聂明建(1961-),湖南鼎城人,博士,从事油菜栽培与育种研究。

Received(收稿日期): 2005-08-01; Accepted(接受日期): 2005-12-15.

RNA及游离尿苷酸(UMP)含量。在显微镜下按李构<sup>[3]</sup>的方法确定发育时期。同时取不育系及对照顶叶为样品。

1.2.3 核糖核酸酶(RNase)活力测定 在张静兰<sup>[4]</sup>方法的基础上进行了改进,取雄蕊鲜样0.2 g,液氮研磨;然后加4 mL 0.02 mol/L的磷酸缓冲液(pH 7)于研钵中,用1 mL微量移液枪,将研钵中核糖核酸酶粗提液分别转移至3个编号的1.5 mL离心管中;在4℃、10 000 × g 条件下离心30 min;取上清液0.1 mL,加0.4 mL含25 μg/mL酵母RNA的醋酸缓冲液;同时,以0.1 mL 0.02 mol/L磷酸缓冲液+0.4 mL 0.1 mol/L醋酸缓冲液+1 mL 95%乙醇为空白对照。以上操作均在冰浴中进行。将上述装有酶提取物和反应底物的离心管放入37℃水浴锅,反应15 min,加1 mL 95%乙醇终止反应;静置冰箱过夜。次日从冰箱取出反应离心管,放入冷冻高速离心机,在4℃、10 000 × g 条件下离心15 min。取上清液在紫外可见分光光度计上测定260 nm处消光值,每个样品测3次,取其平均值。1.0 OD相当于15 min内,核糖核酸酶分解31.7 μg/mL RNA,样品的酶活力以每克干重所含的RNase量来表示,即unit/g DW。酶活力=(测得的样品OD值-空白对照的OD值)×31.7 μg/mL×50。

1.2.4 游离尿苷酸(UMP)和RNA含量测定 取花蕾鲜样0.5 g,液氮研磨,加1 mL 0.6 mol/L高氯酸匀浆。游离尿苷酸

(UMP)及RNA的提取按杨建军等人<sup>[5]</sup>的方法进行。将匀浆用微量移液器转移至1.5 mL离心管中;在10 000 × g、4℃条件下离心5 min;上清液用6 mol/L KOH调节pH至7,用于游离尿苷酸(UMP)的测定,沉淀用冷的90%苯酚水溶液提取RNA。然后在紫外可见分光光度计上分别测定游离尿苷酸<sup>[5]</sup>及RNA含量<sup>[6]</sup>。分别以每克干样所含UMP及RNA毫克数表示,单位均为mg/g DW。

1.2.5 可溶性蛋白质含量测定 雄蕊鲜样0.5 g加液氮研磨后,用0.02 mol/L的磷酸液提取可溶性蛋白。采用Lowry法<sup>[7]</sup>测定含量,以牛血清蛋白作标准曲线,以每克干重样品所含可溶性蛋白质的毫克数表示,单位为mg/g DW。

## 2 试验结果

### 2.1 核糖核酸酶活力的变化

由表1可见,从蕾长≤1~7 mm的各发育期,392A、392BS、629A、86A和湘15A雄蕊的核糖核酸酶活力分别比其对照高43.6%、26.1%、23.6%、55.2%和26.4%。经成对数据t测验<sup>[8]</sup>,392A、86A雄蕊的核糖核酸酶活力显著高于对照,差异达1%显著水平;392BS、629A、湘15A雄蕊的核糖核酸酶活力也显著高于对照,差异达5%显著水平。而不育系与对照叶片的核糖核酸酶活力却无明显差异。

表1 不育系及对照不同发育时期雄蕊中RNase活力

Table 1 The vitality of RNase of Male Sterile Lines and fertile lines in different growth periods(U/g DW)

发育期 Growth period	品种 Cultivar								
	392A	392B	392BS	629A	629B	86A	86B	Xiang 15A	Xiangyou 15
≤1 mm	875	562	821	993	951	2151	1246	1407	1002
1.5 mm	1094	742	920	1297	1086	2291	1668	1472	1142
3 mm	1178	689	1254	2260	1730	2083	1292	1497	1346
5 mm	1200	927	1170	2055	1653	1780	1241	1632	1408
7 mm	718	621	1285	1946	1499	1980	1243	2209	1211
叶片 Leaf	757	794	832	675	650	423	478	371	328

### 2.2 RNA与游离UMP含量的变化

由表2可见,蕾长1~7 mm的各发育期中,392A、392BS、629A、86A和湘15A花蕾的RNA含量分别只有其对照RNA含量的55.8%、53.4%、50%、33.4%和32.7%。经成对数据t测验<sup>[8]</sup>,其含量都极显著低于对照,差异均达1%显著

水平。

与上面结果相反,同期以上各品种中,花蕾的游离尿苷酸(UMP)含量却分别比对照高26.6%、53.9%、22%、8.9%和65%。差异均达5%显著水平。而不育系与对照叶片的RNA和游离尿苷酸(UMP)含量无明显差异。

表2 不育系及对照不同发育时期花蕾RNA与UMP含量

Table 2 The contents of RNA and free UMP of Male Sterile Lines and fertile lines in different growth periods(mg/g DW)

发育期 Growth period		品种 Cultivar								
		392A	392B	392BS	629A	629B	86A	86B	Xiang 15A	Xiangyou 15
1 mm	RNA	11.21	22.43	9.62	9.22	20.25	7.67	21.43	7.01	19.18
	UMP	2.95	1.98	2.77	3.10	2.51	3.60	3.36	3.85	2.87
3 mm	RNA	12.03	18.56	11.64	9.04	19.04	6.36	24.90	11.13	27.64
	UMP	3.43	2.05	4.57	3.10	2.62	3.39	3.15	6.03	2.96
5 mm	RNA	13.32	23.64	11.08	10.23	16.08	7.03	20.62	9.44	21.06
	UMP	5.45	4.98	5.34	3.57	2.89	3.23	2.95	4.40	2.92
7 mm	RNA	12.33	22.99	14.42	10.76	23.11	9.14	23.36	8.48	20.98
	UMP	6.98	5.85	7.40	4.3	3.11	3.33	2.95	3.62	2.1
叶片	RNA	26.54	26.76	22.66	20.32	22.91	27.88	27.02	26.76	26.04
Leaf	UMP	2.38	2.43	2.79	1.85	1.23	2.91	2.78	2.48	2.34

### 2.3 可溶性蛋白质含量的变化

由表3可见,蕾长 $\leq 1\sim 7$  mm各发育时期不育系与对照的可溶性蛋白质含量差距逐渐加大,至7 mm时达最大,此时392B分别比392A和392BS高74.7%和212.4%;629B比629A高85.3%;86B比86A高87.9%;湘油15比湘15A高47.8%。经成对数据的 $t$ 测验<sup>[8]</sup>,86A、湘油15A雄蕊的可溶

性蛋白质含量显著低于对照,差异达1%显著水平;392BS、629A雄蕊的可溶性蛋白质含量也明显低于对照,差异达5%显著水平。但392A与392B雄蕊的可溶性蛋白质含量无显著差异,这是因为392A初花期有微粉的缘故。而同时取样的不育系与对照叶片的可溶性蛋白质含量无明显差异。

表3 不育系及对照不同发育时期雄蕊可溶性蛋白质含量

Table 3 The soluble protein contents of Male Sterile Lines and fertile lines in different growth periods(mg/g DW)

发育期 Growth period	品种 Cultivar								
	392A	392B	392BS	629A	629B	86A	86B	Xiang 15A	Xiangyou 15
$\leq 1$ mm	5.63	5.87	3.75	6.66	7.88	4.88	7.23	4.30	6.56
1.5 mm	8.13	9.61	5.14	7.18	8.22	4.25	5.50	6.45	7.48
3 mm	7.48	8.38	5.69	9.05	10.75	4.63	7.13	6.82	8.51
5 mm	7.75	10.75	4.63	6.45	8.23	6.38	7.63	7.23	9.27
7 mm	7.60	13.28	4.25	4.38	8.11	4.12	7.74	6.09	9.00
叶片 Leaf	4.99	4.25	4.07	5.41	5.65	5.13	5.32	7.72	7.80

### 3 讨论

舒孝顺等<sup>[9]</sup>研究表明,水稻温敏不育系的核糖核酸酶活力升高,引起了RNA含量的下降,阻碍了蛋白质的合成,使不育系新陈代谢紊乱,从而导致不育系花药的败育。据此,他推测编码核糖核酸酶的基因,可能就是温敏核不育系水稻的不育基因。杨建军<sup>[5]</sup>、黄雪清<sup>[10]</sup>等也认为,核糖核酸酶活力的增强与植物的雄性不育表现有直接关系。本研究证明,不同类型的5种甘蓝型油菜雄性不育系,在花药发育的不同时期,核糖核酸酶活力及游离尿苷酸(UMP)含量显著高于对照,而RNA及可溶性蛋白质含量则显著低于对照,其差异均达显著水平;5个不育系雄蕊的核糖核酸酶活力与RNA含量有负的直线相关性,相关系数为 $-0.9796^{**}$ 。因此,我们推测甘蓝型油菜雄性不育系核糖核酸酶活力异常升高,可能降解了自身的RNA,直接导致蛋白质合成减少(可溶性蛋白质含量低),也使得游离尿苷酸(UMP)含量上升。细胞中的蛋白质,既是许多新陈代谢活动的催化剂,又是各种细胞器、膜系统的组成成分。所以,蛋白质含量的下降直接导致甘蓝型油菜雄性不育系的雄蕊败育。我们认为核糖核酸酶活力增强与甘蓝型油菜雄性不育密切相关。至于是何原因引起了甘蓝型油菜雄性不育系核糖核酸酶活力的异常增强,还待深入研究。

### References

- [1] He Y-H(何业华). On the use of genetic engineering in the research of obtaining male sterility lines and recovery lines of rapeseed (*Brassica napus* L.). A Report of Post-doctorate Research Work, Hunan Agricultural University, 2001. pp 1-20(in Chinese with English abstract)
- [2] Zhou X-R(周雪荣), Peng R-W(彭仁旺), Fang R-X(方荣祥), Chen Z-H(陈正华), Mang K-Q(莽克强). Obtaining male sterile oilseed rape by specific expression of RNase gene. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1997, 24(6): 531-536(in Chinese with English abstract)
- [3] Guan C-Y(官春云). Studies of Ecological Characters and Genetics Breeding on Rapeseed(油菜生态和遗传育种研究). Changsha: Hunan Scientific and Technical Press, 1990. pp 190-210(in Chinese with English abstract)
- [4] Zhang J-L(张静兰), Xu G-F(徐桂芳), Tang D-T(唐定台), Niu Y-X(牛玉仙). Activity changing of RNase in the cotyledon segment of *Phaseolus vadiatus* L. during dedifferentiation. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1984, 26(4): 381-358(in Chinese)
- [5] Yang J-J(杨建军), Yang H-Z(杨汉中), Cao Z-X(曹宗巽). The abnormalities of metabolism of nucleic acid of Taiguhe sterile wheat in anther abortion processes. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1988, 14(4): 367-372(in Chinese)
- [6] Li J-W(李建武), Xiao N-G(萧能康). Experimental Theories and Methods of Biological Chemistry(生物化学试验原理和方法). Beijing: Peking University Press, 1998. pp 42-46(in Chinese)
- [7] Wang J-Z(汪家政), Fan M(范明). Manual of Protein Technology(蛋白质技术手册). Beijing: Science Press, 2002. pp 42-46(in Chinese)
- [8] Tang Q-Y(唐启义), Feng M-G(冯明光). DPS Data Processing System(DPS数据处处理系统). Beijing: Science Press, 2002(in Chinese)
- [9] Shu X-S(舒孝顺), Chen L-B(陈良碧), Lu J-H(吕金海). Activity changing of RNase in the thermo-sensitive genic male sterile *indica* rice during fertility-sensitive period. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2000, 26(3): 381-384(in Chinese with English abstract)
- [10] Huang X-Q(黄雪清), Gao D-Y(高东迎), Yang A-N(杨安南), Sun L-H(孙立华), Zhang J-Y(张金渝). Metabolism of nucleic acid and protein in the anther, spikelet and young panicle of rice (*Oryza sativa*) after treatment with chemical Hybridizing Agent III. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2001, 27(6): 827-831(in Chinese with English abstract)