

# 木薯亲本正反交亲和力与授粉柱头的蛋白质组学分析

叶剑秋<sup>1,2</sup>, 安飞飞<sup>2</sup>, 肖鑫辉<sup>2</sup>, 王 明<sup>2</sup>, 许瑞丽<sup>2</sup>, 万仲卿<sup>2</sup>, 李开绵<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>海南大学农学院, 海口 570228; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/  
农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室, 海南儋州 571737)

**摘要:**为研究木薯不同亲本杂交亲和力的差异, 分别以华南5号、华南6号、华南7号为亲本进行正反交, 统计不同组合间结实率的差异。同时对受精柱头蛋白质进行分析, 研究柱头对杂交亲和力影响的蛋白质调控水平。结果表明: SC5(♀) × SC7(♂) 平均结实率最高为 26.22%, SC7(♀) × SC5(♂) 平均结实率最低为 11.13%。通过双向电泳和质谱法分析母本 SC5 和 SC7 授粉柱头的蛋白质变化, 得到 27 个差异蛋白质点, 其中 19 个蛋白质出现上调表达, 这些差异表达蛋白质分别参与碳代谢及能量代谢、分子伴侣和氨基酸代谢; 而 8 个蛋白质下调表达, 它们分别参与蛋白质合成及氢氰酸代谢; 表明这些代谢途径对木薯亲和力高低有一定的影响。

**关键词:**木薯; 正反交; 结实率; 蛋白质组

## Parental Reciprocal Cross Affinity of Cassava and Proteomic Analysis of Stigma

YE Jian-qiu<sup>1,2</sup>, AN Fei-fei<sup>2</sup>, XIAO Xin-hui<sup>2</sup>, WANG Ming<sup>2</sup>, XU Rui-li<sup>2</sup>, WAN Zhong-qing<sup>2</sup>, LI Kai-mian<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agriculture, Hainan university, Haikou 570228; <sup>2</sup>Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Germplasm Resources Conservation and Utilization of Cassava, Danzhou Hainan 571737)

**Abstract:** In order to study the affinity differences of hybrid cassava between different parents, respectively, South China 5, South China 6 and South China 7 were as the materials, to conduct reciprocal cross, then fertility rates was calculated between different combinations. The proteins from stigma after fertilization were also analyzed, due to exploring the regulation mechanisms of stigma influence on hybridization affinity. The results showed that: fertility rates in SC5(♀) × SC7(♂) was highest, 26.22%, while SC7(♀) × SC5(♂) was lowest, 11.13%. By two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis of pollinated stigma protein changes in female parent SC5 and SC7, 27 differential expression proteins were identified in which 19 were up-regulated. These differentially expressed proteins involved in carbon metabolism and energy metabolism, molecular chaperone and amino acid metabolism, while 8 protein spots were down-regulated, its involved in protein synthesis and hydrocyanic acid metabolism. It indicated that these metabolic processes were related with high affinity of cassava.

**Key words:** cassava; reciprocal cross; fertility rate; proteome

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 高度杂合, F<sub>1</sub> 强烈分离, 难以进行定向选择。要从 2 个优势亲本的杂种后代中选出一个理想的重组类型, 需要对大量的 F<sub>1</sub> 单株进行选育, 大大地增加了杂交授粉的工作

量, 同时也加大了田间栽培和选择工作。

我国木薯品种改良工作可追溯到 20 世纪 50 年代, 通过比较评选, 推广出高产、适应性广的华南 205 和东莞红尾, 育成早熟高产的甜品种华南

收稿日期: 2014-10-16 修回日期: 2014-11-04 网络出版日期: 2015-02-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150206.1647.022.html>

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630032012011); 农业部物种保护项目(NB2012-2130135)

第一作者主要从事木薯种质资源评价与创新工作。E-mail: yejianqiu2006@126.com

通信作者: 李开绵, 研究方向为木薯种质创新及新品种选育。E-mail: likaimian@sohu.com

6068<sup>[2]</sup>。1980–2000 年间,中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所、广东省农业科学院和广西亚热带作物研究所等单位相继育成华南 124、华南 8002、华南 8013 等高产耐寒的木薯新品种。2000 年后,又育成华南 5 号、华南 6 号、华南 7 号、华南 8 号和华南 9 号等高产高淀粉和食用木薯新品种。

选择优良品种作为亲本,进行杂交育种是我国木薯品种改良的重要途径<sup>[3]</sup>;然而当前在木薯亲本选配时存在很大盲目性。通过开展亲本间杂交亲和力的研究,有助于选配稔实率高的亲本,获得较多的杂交种子,为选育优良专用性品种提供物质基础。目前国内有关植物杂交亲和力研究包括杜鹃花属<sup>[4]</sup>、切花菊<sup>[5]</sup>、苹果<sup>[6]</sup>、小豆<sup>[7]</sup>、黄花菜<sup>[8]</sup>、粳稻与籼稻<sup>[9]</sup>以及不同属间研究<sup>[10-13]</sup>,有关木薯方面的研究较少。亲本间杂交不育以及正反交遗传差异经常影响到杂交后代获得。本研究以华南 5 号、华南 6 号、华南 7 号为亲本进行正反交,统计不同组合间稔实率。同时对授粉柱头蛋白质进行分析,研究柱头对杂交亲和力影响的蛋白质调控水平,为木薯杂交育种亲本的选配提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

本研究所用的亲本材料华南 5 号(简称 SC5,下同)、华南 6 号(SC6)和华南 7 号(SC7)均选自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所国家木薯种质资源圃。3 个品种分别配组,设计正反杂交 6 个组合(表 1)。

表 1 SC5、SC6 和 SC7 木薯品种正反杂交授粉情况

Table 1 Cassava varieties SC5, SC6 and SC7 reciprocal hybridization situation

母本 Female	父本 Male	授粉时间(年) Time	授粉花数 Pollinate flower number	结果数 Fruit number	稔实率(%) Fertility rates	平均稔实率(%) Average fertility rates
SC5	SC6	2011	388	90	23.20	21.13
		2012	10340	1971	19.06	
SC6	SC5	2011	307	59	12.70	14.42
		2012	2974	480	16.13	
SC5	SC7	2011	368	85	23.10	26.22
		2012	11533	3383	29.33	
SC7	SC5	2011	648	67	10.34	11.13
		2012	2291	273	11.92	
SC6	SC7	2011	299	105	35.12	28.88
		2012	3259	738	22.64	
SC7	SC6	2011	423	104	24.59	21.43
		2012	2870	524	18.26	

### 1.2 试验方法

**1.2.1 亲本间杂交** 在雌花开放前,在所授粉的母株上选定当天开放的花序,用作父本的雄花也同时选定花序,套 PVC 塑料袋隔离。采下雄花,使雄蕊花药轻轻地接触雌蕊的柱头,授粉工作在每天的 12:30~15:00 间进行,授粉后套上新的 PVC 塑料袋,挂上标签,写明杂交组合、授粉日期和花数。30 d 后统计稔实率。

**1.2.2 柱头蛋白质提取与分离** 授粉后 1 d,采集柱头,参照 S. Chen 等<sup>[14]</sup>苯酚抽提法提取授粉柱头蛋白质。

**1.2.3 差异蛋白质分析与鉴定** 用 Delta 2D 软件分析蛋白质双向电泳图谱,从中选择差异倍数在 1.5 倍以上的蛋白质点。挖取差异蛋白质点,加入 60  $\mu$ L 超纯水对蛋白质点进行清洗,后加入 200  $\mu$ L 脱色液(25 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ),超声波脱色 5 min,用胰蛋白酶液酶解,37  $^\circ\text{C}$  水浴过夜。取完全酶解的样品,3000 r/min 离心 10 s 后按顺序将样品点到 Anchorchip 标靶上,置入质谱仪(Bruker)中扫描,并利用 NCBI 数据库进行搜库匹配,确定差异点蛋白质的信息。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同配组正反杂交授粉结果比较

以华南 5 号、华南 6 号和华南 7 号 3 个品种分别作父母本进行了杂交授粉组合,共计获得 6 个正反交组合,其杂交结实率见表 1。

从表 1 可以看出,不同父母本正反交稔实率差异明显;SC5(♀)×SC6(♂)平均稔实率为 21.13%,SC6(♀)×SC5(♂)平均稔实率为 14.42%,正反交相差 6.71%;SC5(♀)×SC7(♂)平均稔实率为 26.22%,SC7(♀)×SC5(♂)平均稔实率为 11.13%,正反交相差 15.09%;SC6(♀)×SC7(♂)平均稔实率为 28.88%,SC7(♀)×SC6(♂)平均稔实率为 21.43%,正反交相差 7.45%。可见,不同父母本组配的正反交稔

实率也不同,以 SC5 和 SC6 作母本的杂交结实率相对较高。

## 2.2 亲本正反交柱头蛋白质分离结果

正反交结实率试验表明,SC5 作母本的结实率显著高于 SC7 作母本的结实率,选择这 2 个品种,在杂交授粉后 1 d,提取和定量柱头蛋白质,经双向电泳分离后,凝胶染色和扫描,得到了重复性较好的柱头蛋白质双向电泳图谱(图 1)。

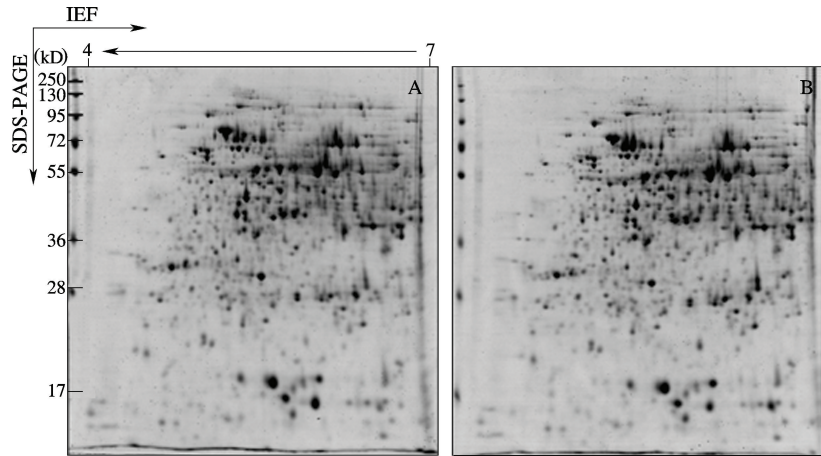


图 1 木薯亲本 SC5(右)和 SC7(左)杂交授粉后雌蕊柱头蛋白质的双向电泳图谱

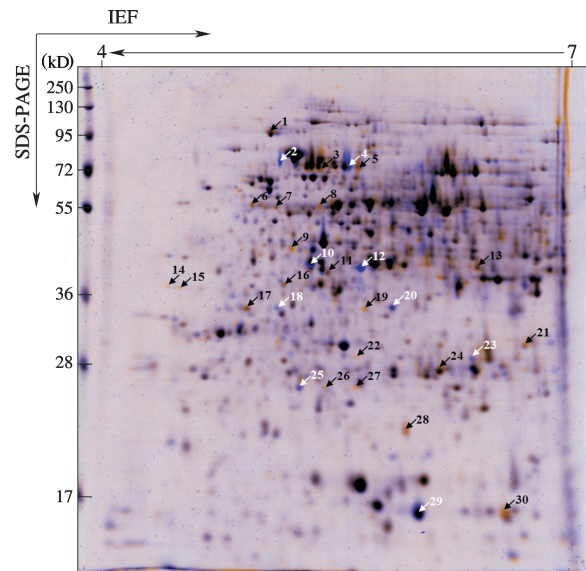
Fig. 1 2-DE gel profiles of stigma of SC5 (right) and SC7 (left) after pollination in cassava

## 2.3 正反交差异蛋白质的分布及鉴定结果

利用 Delta 2D 软件分别将柱头蛋白质双向电泳图谱进行比对,将 3 次重复图谱中差异表达水平在 1.5 倍以上的蛋白点标出(图 2)。

以授粉 1 d 的 SC7 雌蕊柱头蛋白质双向电泳图谱为对照,经 Delta 2D 分析软件比对发现 30 个重复性较好的差异蛋白质位点,差异表达水平均在 1.5 倍以上,其在图谱中的分布如图 2 所示(图 2 为 Delta 2D 软件处理后的 SC5 和 SC7 双向电泳的叠加图)。当蛋白质点重合显示黑色时,表示两者无显著差异,当蛋白质点出现差异时,仅显示蓝色或黄色,如点 2 仅在 SC7 柱头图谱中表达,在图谱中显示为蓝色点。

在 30 个差异表达的蛋白质点中,上调表达蛋白质点有 21 个,下调表达的蛋白质点有 9 个。经过二级质谱技术 MALDI-TOF-TOF-MS/MS 鉴定到其中的 27 个蛋白,包括 8 个下调蛋白点及 19 个上调蛋白点(表 2)。这些差异蛋白质涉及能量代谢(8 个)、分子伴侣(4 个)、蛋白质合成(3 个)、HCN 代谢(2 个)、氨基酸代谢(1 个)、结构蛋白(1 个)共 6 个功能群,此外还包括 8 个未知功能的蛋白质。其中在亲和力较好的 SC5 中,具有优势表达的蛋白质包括:参与能量代谢的 8 个蛋白质,除了果糖二磷酸醛



黑色箭头所指为表达水平上调的蛋白点;

白色箭头所指为表达水平下调的蛋白点;

蓝色点:SC7 柱头蛋白质;黄色点:SC5 柱头蛋白质

Black arrow indicates up-regulated matches after polyploidy,

White arrow indicates down-regulated matches,

Blue arrow is stigma protein of SC7, Yellow arrow is stigma protein of SC5

图 2 SC5 与 SC7(对照)柱头差异蛋白质在图谱中的分布

Fig. 2 Differential proteins distribution in stigma profiles between SC5 and SC7

缩酶表达下调外, ATP 合酶、丙酮酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶、甲硫氨酸亚砷还原酶、磷酸丙糖异构酶等 7 个蛋白质表达水平上调。分子伴侣为热激蛋白,

其表达水平上调。相反,参与蛋白质合成相关的蛋白质延长因子、蛋白酶体及起始因子,其表达水平低于 SC7。

表 2 柱头差异蛋白质鉴定结果

Table 2 Identification of differential expressed proteins in stigma

编号 Code	蛋白名称 Protein name	序列号 Accession number	理论等电 点/分子量 (kD)pI/Mass	差异表达倍数 Fold changes
碳代谢及能量代谢相关蛋白 Carbohydrate and energy metabolism associated proteins				
6	ATP 合酶 ATP synthase subunit beta vacuolar, putative- <i>R. communis</i>	XP_002510596	4.99/54.35	2.25 ± 0.19( + )
7	ATP 合酶 ATP synthase subunit beta vacuolar, putative- <i>R. communis</i>	XP_002510596	4.99/54.35	2.14 ± 0.20( + )
8	ATP 合酶 ATP synthase beta subunit, putative- <i>R. communis</i>	XP_002532227	6.00/59.93	3.24 ± 0.22( + )
11	丙酮酸脱氢酶 Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit isoform 1- <i>Zea mays</i>	AAC72192	5.54/39.81	1.69 ± 0.12( + )
13	磷酸甘油酸激酶 Phosphoglycerate kinase, putative- <i>R. communis</i>	XP_002513352	5.65/42.39	2.35 ± 0.18( + )
15	甲硫氨酸亚砷还原酶 Methionine sulfoxide reductase family protein- <i>P. trichocarpa</i>	XP_002318692	6.59/21.38	+ ∞
20	果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase, putative- <i>R. communis</i>	XP_002526308	8.64/42.79	2.36 ± 0.20( - )
24	磷酸丙糖异构酶 Triosephosphate isomerase- <i>Glycine max</i>	AAT46998	5.87/27.23	1.60 ± 0.12( + )
分子伴侣 Chaperones				
1	热激蛋白 82 Heat shock protein 82( HSP82)- <i>O. sativa</i>	CAA77978	4.99/80.19	2.08 ± 0.16( + )
3	热激蛋白 Heat Shock 70kD protein- <i>G. max</i>	CAA44620	5.36/70.88	1.95 ± 0.13( + )
5	热激蛋白 Heat shock protein, putative- <i>R. communis</i>	XP_002518324	6.10/71.12	3.68 ± 0.24( + )
30	热激蛋白 18.1 kD class I heat shock protein	P27879	5.20/16.47	2.29 ± 0.13( + )
蛋白质合成 Protein biosynthesis				
12	延长因子 Elongation factor Tu, chloroplastic-like- <i>Vitis vinifera</i>	XP_002277301	6.24/52.69	- ∞
25	蛋白酶体 Proteasome subunit beta type 6,9, putative- <i>R. communis</i>	XP_002527995	5.17/24.87	1.80 ± 0.18( - )
29	起始因子 Initiation factor eIF5-A- <i>M. esculenta</i>	AAF79401	5.35/21.06	1.70 ± 0.18( - )
氢氰酸代谢 HCN metabolism				
2	Linamarase - <i>M. esculenta</i>	AAB22162	5.52/61.37	- ∞
4	Linamarase- <i>M. esculenta</i>	AAB22162	5.52/61.37	- ∞
氨基酸代谢 Amino acid metabolism				
14	组氨酸激酶 Sensory transduction histidine kinase, putative- <i>R. communis</i>	XP_002521152	6.52/16.74	+ ∞
结构 Structure				
22	膜蛋白 Remorin- <i>M. indica</i>	AGB07445	5.69/22.02	+ ∞
未知功能蛋白 Function unknown proteins				
9	未知蛋白 Unknown- <i>P. trichocarpa</i>	ABK93198	8.36/41.05	+ ∞
17	假定蛋白 Hypothetical protein SORBIDRAFT_08g018560- <i>Sorghum bicolor</i>	XP_002442341	9.47/45.53	2.92 ± 0.16( + )
18	假定蛋白 Conserved hypothetical protein- <i>R. communis</i>	XP_002525028	8.45/7.91	- ∞
19	未知蛋白 Protein with unknown function- <i>R. communis</i>	XP_002519452	6.00/23.68	+ ∞
21	假定蛋白 Conserved hypothetical protein- <i>R. communis</i>	XP_002523631	8.14/31.96	1.72 ± 0.10( + )
23	假定蛋白 Hypothetical protein RCOM_0722880- <i>R. communis</i>	XP_002524850	6.29/45.50	2.98 ± 0.19( - )
27	未知蛋白 Unnamed protein product- <i>G. max</i>	CAN08825	5.16/25.13	2.22 ± 0.15( + )
28	假定蛋白 Hypothetical protein PRUPE_ppa023969mg, partial- <i>Prunus persica</i>	XP_007199337	7.85/17.25	2.34 ± 0.19( + )

( + )表示蛋白质点表达上调; ( - )表示蛋白质点表达下调

( + ) indicate up-regulated matches after polyploidy, and ( - ) indicate down-regulated matches

对成功鉴定到的27个蛋白质按功能分类,其中参与能量代谢的蛋白质占30%,分子伴侣占15%,蛋白质合成占11%,氢氰酸代谢占7%,结构蛋白占4%,氨基酸代谢占4%,未知功能蛋白占29%。表明亲和力与这些代谢过程息息相关,多种代谢共同调节木薯授粉后亲本的亲和过程,其中能量代谢起重要作用。

### 3 讨论

不同种质作母本其稔实率差异明显,从而说明不同种质作为母本,其广义的亲和力有很大的差异,这跟单一组合的正反交亲和力的结果一致,观点与李开绵等<sup>[15]</sup>的研究结果一致。3个品种中,SC5作母本较好。不同的种质作父本其稔实率差异明显,从而说明不同种质作为父本,其广义的亲和力有很大的差异,这跟单一组合的正反交亲和力的结果一致。3个品种中,SC7作父本较好。

杂交亲和力高低与很多因素有关,如花粉活力、授粉数量、日最高和最低温度及日最高和最低湿度等<sup>[16]</sup>。在杂交过程中,亲本组配正反交对杂交亲和力也有较大的影响,如李开绵等<sup>[15]</sup>通过正反交试验得出同一组合的正反交其亲和力是有差异的,而稔实率的高低与母本的关系颇大。本研究也有SC5、SC6、SC7的正反交试验,共配组了6个正反交组合,试验结果表明,不同父母本正反交稔实率差异明显;其中SC5×SC7平均稔实率为26.22%,SC7×SC5平均稔实率为11.13%。因此,在杂交过程中,正反交对结实率有较大的影响。本试验结果与李振坚等<sup>[17]</sup>对重唇石斛的研究结果一致。

本研究选用正反交稔实率相差最大的母本SC5和SC7研究花柱对杂交亲和力的蛋白质调控水平,经过二级质谱技术鉴定到其中的27个蛋白质中,19个蛋白质点出现上调表达,包括7个参与碳代谢及能量代谢的蛋白,4个分子伴侣,1个参与氨基酸代谢的蛋白,1个结构蛋白以及6个未知功能的蛋白质。说明与SC7相比,SC5的柱头参与这几类的代谢活动更为旺盛。同样参与蛋白质合成及氢氰酸代谢的蛋白均表达下调,表明此代谢过程也与高亲和力息息相关。而与对照相比,出现的组氨酸激酶

(点14)可能与SC5×SC7的高亲和力有很大的相关性,由于无法排除品种间柱头蛋白质存在的差异,因此蛋白质与高亲和力的相关性仍需进一步研究。

杂交能够促进基因重组从而获得更好的性状,因此广泛开展杂交育种研究是遗传改良的重要途径之一<sup>[18]</sup>。杂交亲和性与很多因素有关,如花粉的生活力、日最高、最低温度和湿度及双亲的遗传背景等。蛋白质组的研究结果也显示杂交亲和性是一个复杂的生理过程,是很多外界环境因素与蛋白质相互作用协调的结果。同一母本,不同父本间杂交亲和力的差异仍然需要从生理结构、显微结构、分子水平等多个方面进行更深入的研究。

### 参考文献

- [1] 邹积鑫. 木薯种质资源遗传多样性分析与干物质产量的分子标记[D]. 儋州:华南热带农业大学,2005:12-13
- [2] 黄洁. 木薯丰产栽培技术[M]. 海口:三环出版社,2007:24-37
- [3] 叶剑秋. 我国木薯选育种进展[J]. 热带农业科学,2009,29(11):115-119
- [4] 张长芹,冯宝钧,吕元林. 杜鹃花属的杂交育种研究[J]. 云南植物研究,1998,20(1):94-96
- [5] 朱珺,何俊平,仲为伟,等. 多头切花菊品种杂交亲和力分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):161-163
- [6] 刘桂森,王同坤,张立彬. 常见苹果品种杂交亲和力试验[J]. 山西果树,1984(4):12-14
- [7] 濮绍京,石峰,金文林,等. 7个小豆核心种质杂交亲和力的研究[J]. 北京农学院学报,2003,18(2):81-85
- [8] 刘金郎. 黄花菜不同品种杂交亲和力研究[J]. 北方园艺,2005(5):64-65
- [9] 沈福成,陈文强,潘建慧. 贵州高原粳稻与矮秆籼稻杂交亲和力研究[J]. 贵州农业科学,1986(6):64-65
- [10] 巩振辉,何玉科,王鸣. 白菜与白芥属间杂交亲和力的研究[J]. 河南科技学院学报:自然科学版,1994(2):29-31
- [11] 巩振辉,何玉科,王鸣,等. 白菜与白芥属间花粉-柱头相互作用的研究[J]. 西北农业学报,1994(1):35-38
- [12] 刘世雄,娄青,崔文荣. 大白菜与7种芸苔属植物种间杂交亲和力的研究[J]. 河北农业大学学报,1989(1):34-38
- [13] 魏宝琴. 白菜与十字花科不同蔬菜杂交亲和力的研究[J]. 辽宁农业科学,1987(4):52-53
- [14] Chen S, Martin C, Maya-Mendoza A, et al. Reduced expression of lamin A/C results in modified cell signaling and metabolism coupled with changes in expression of structural proteins [J]. J Proteome Res, 2009, 8(11):196-211
- [15] 李开绵,林雄,黄洁,等. 木薯种质花期观察和亲和力的初步研究[J]. 辽宁农业科学,1996(2):53-59
- [16] 叶要妹,张俊卫,齐迎春,等. 百日草柱头可授性和花粉生活力的研究[J]. 中国农业科学,2007,40(10):2376-2381
- [17] 李振坚,亢秀萍,王雁,等. 重唇石斛传粉生物学与显微动态研究[J]. 西北植物学报,2009(9):1804-1810
- [18] 栾启福,李彦杰,姜景民. 利用近红外光谱对杂种松及其亲本的鉴别分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(6):1083-1088