

大白菜新型胞质雄性不育系及其保持系花药 不同发育时期内源激素动态变化的研究

冯忠梅¹, 张凤兰², 张德双², 于贤昌¹

(1. 山东农业大学 园艺学院, 山东 泰安 271018; 2. 北京市农林科学院蔬菜中心, 北京 100089)

摘要: 利用细胞质雄性不育系制种是生产白菜一代杂交种子最经济、有效的途径之一, 植物内源激素在植物体内普遍存在, 并在植物生长发育的各个阶段起着重要的调节作用。大量的研究表明, 雄性不育系的营养器官或生殖器官中内源激素含量与保持系不同, 雄性败育是花器官尤其是雄蕊中激素不平衡的结果。利用酶联免疫测定技术研究大白菜新型胞质雄性不育系及其保持系不同发育时期花药组织中 IAA、GA₃、ABA 和 ZR 含量的动态变化, 结果表明: 在花药发育过程中, 不育系花药组织中 ABA、IAA、GA₃ 和 ZR 含量及 ZR/ABA 比值的变化均出现异常。在第 3 时期(花蕾长 2.0~3.0 mm), 不育系的 IAA、GA₃ 和 ZR 含量显著低于保持系, ABA 含量显著高于保持系, ZR/ABA 比值低于保持系。这一时期正好是不育系小孢子明显败育的时期。由此认为, 该时期不育系花药组织中激素含量的变化及平衡的破坏可能影响了小孢子的正常发育, 引起小孢子败育, 导致大白菜的雄性不育。

关键词: 大白菜; 细胞质雄性不育系; 花药; 发育时期; 激素

中图分类号: S634.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)04-0040-04

Study on Changes of Hormones in Anther at Different Development Stage in Cytoplasmic Male Sterility Line and Its Maintainer of Chinese Cabbage

FENG Zhong-mei¹, ZHANG Feng-lan², ZHANG De-shuang², YU Xian-chang¹

(1. Horticulture Department, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: Changes of contents of IAA, ABA, GA₃ and ZR in anther at different development stage in Cytoplasmic Male Sterility (CMS) line and its maintainer of Chinese cabbage were investigated by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). It is observed that changes of contents of IAA, ABA, GA₃ and ZR in anther of Cytoplasmic Male Sterility line were different to its maintainer. At the third stage (the length of flora bud was 2.0—3.0 mm), the contents of IAA, GA₃ and ZR in CMS and the value of ZR/ABA were remarkably lower than its maintainer. However, the contents of ABA in CMS were significantly higher than its maintainer. The microspores have just started to be sterile at this stage. It is concluded that the deficiency of IAA, GA₃ and ZR and over product of ABA and breaking of hormonal equilibrium induced male sterility in Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage; Cytoplasmic male sterility; Anther; Development stage; Hormones

利用细胞质雄性不育系制种是生产白菜一代杂交种子最经济、有效的途径之一, 因此受到世界各国育种者的重视。近 20 年来, 国内外在十字花科作物上研究最多、利用最广泛的是 Ogu CMS (萝卜细胞质雄性不育) 和 Pol CMS (波里马细胞质雄性不育)。但

是 Ogu CMS 存在植株黄化, 生长迟缓, 蜜腺退化和配合力差的缺陷, 至今未能在生产上得到利用。经过改良的萝卜胞质大白菜雄性不育系虽克服了苗期黄化和蜜腺严重退化的问题, 但随着回交代数的增加, 材料退化较快, 部分幼苗表现畸形, 杂交组合优

收稿日期: 2004-11-13

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6012008); 国家 863 项目(2001AA241124, 2002AA207012)

作者简介: 冯忠梅(1980—), 女, 山东泰安人, 硕士, 主要从事白菜遗传等方面的研究工作; 张凤兰为通讯作者。

势弱,配合力差,应用前景暗淡。国际上认为 *Pol CMS* 是当今世界上有生产价值的细胞质雄性不育系,但对温度敏感仍然是 *Pol CMS* 的一个难以解决的重要问题。1996年,北京蔬菜研究中心从法国引进了一个新的胞质雄性不育源,该材料为甘蓝型油菜。该不育源不育性稳定,不育率和不育度均为100%,回交多代不退化,有较好的应用前景,为一理想的新型雄性不育材料。

植物内源激素是代谢反应的产物,在生长发育的各个阶段起重要的调节作用。大量的研究表明,雄性不育系的营养器官或生殖器官中内源激素含量与保持系的不同^[1,2],雄性败育是花器官尤其是雄蕊中激素不平衡的结果^[3]。但在大白菜中有关这方面的研究报道很少。本研究探讨了新型大白菜胞质不育系花药在不同发育阶段内源激素的动态变化,采用比较分析的方法,从内源激素水平的变化及激素平衡的角度分析了小孢子败育的原因。这对于认识雄性不育发生的生理机制及指导人工调控育性有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验以新型大白菜胞质不育系 2002-640 及其保持系 2002-482 作为试材,不育系已连续回交 6 代以上,其形态性状与保持系相同,为晚熟、直筒、白心类型。试材由北京市农林科学院蔬菜研究中心提供。

材料于 2002 年 8 月 30 日晚在培养皿中催芽,次日早将萌动种子放入 3℃冰箱低温处理 20 d 后,播种到营养钵,在空调温室中(日温 25℃,夜温 20℃)育苗,11 月 1 日定植于日光温室中,正常田间管理。于盛花期从生长势一致的植株中取花蕾,花蕾长度不同,其花药组织中花粉的发育时期不同,按照花蕾长度将其分为 6 个时期,分别为:1. 孢原母细胞或四分子期(蕾长<1.0 mm), 2. 单核小孢子期(蕾长 1.0~2.0 mm), 3. 双核小孢子期(蕾长 2.0~3.0 mm), 4. 三核小孢子期(蕾长 3.0~4.0 mm), 5. 成熟花粉 1(蕾长 4.0~5.0 mm), 6. 成熟花粉 2(蕾长>5.0 mm)。分别剥取每个时期花药 0.2 g 保存于-80℃冰箱中,备用。

1.2 内源激素的测定

利用间接酶联免疫法(ELISA)测定 IAA, ABA, GA₃和 ZR, 各种试剂盒由中国农业大学科技服务部

提供,重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 激素含量的动态变化

2.1.1 ABA 含量的动态变化 不育系和保持系花药不同发育时期 ABA 含量的动态变化情况见图 1。从图 1 可见,不育系和保持系两者的变化趋势不同,不育系的 ABA 含量在花药整个发育过程中呈先升后降再升的趋势,而保持系是先升后降的趋势。花蕾长 2.0 mm 以前,不育系和保持系 ABA 含量无差异,以后不育系的 ABA 含量一直高于保持系。花蕾长 2.0~3.0 mm 时,不育系 ABA 含量迅速上升达峰值,此期不育系的 ABA 含量是保持系的 1.43 倍,显著高于保持系。而这一时期正好是不育系小孢子开始出现液泡、绒毡层细胞开始解体,小孢子亦开始败育,且形状多变,有的为长圆形,有的为三角形或圆球形。由此可以看出,小孢子败育的发生与不育系花药内高的 ABA 含量有关。

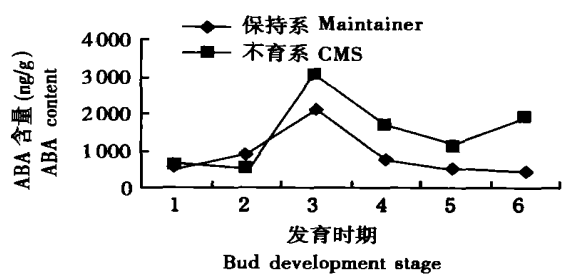


图 1 花药不同发育时期 ABA 含量比较

Fig 1 Comparison of ABA content in anther at different development stage

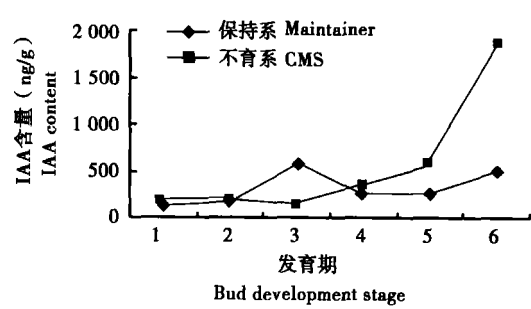


图 2 花药不同发育时期 IAA 含量

Fig 2 Comparison of IAA content in anther at different development stage

2.1.2 IAA 含量的动态变化 从图 2 可知,不育系 2002-640 及其保持系 2002-482 花药发育过程中 IAA 含量的变化趋势不同,不育系的 IAA 含量在花药整个发育过程中呈先缓升后急升的趋势,而保持系是先升后降再升的趋势。花蕾长 2.0 mm 以前不育系

和保持系的含量无差异,花蕾长 2.0~3.0 mm,不育系的 IAA 含量显著低于保持系,保持系 IAA 含量是不育系的 4.02 倍,这一时期 IAA 的亏损可能导致了小孢子败育的发生。

2.1.3 ZR(玉米素核苷)含量的动态变化 由图 3 可知,不育系 2002-640 及其保持系 2002-482 花药发育过程中 ZR 含量的动态变化不同。不育系在花药整个发育过程中一直呈缓慢上升的趋势,ZR 含量升幅变化不大,而保持系则是先升后降的趋势。花蕾长 2.0 mm 以前,不育系与保持系花药内 ZR 含量没有差异;花蕾长 2.0~4.0 mm,保持系花药内 ZR 含量迅速增加并达到峰值,而这一时期的不育系 ZR 含量显著低于保持系,保持系 ZR 含量是不育系的 9.81 倍。这一时期不育系花药内 ZR 含量的严重亏缺可能是导致小孢子不能正常发育的又一因素。

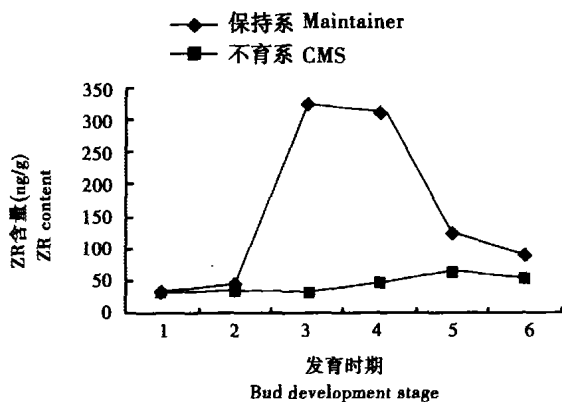


图 3 花药不同发育时期 ZR 含量

Fig 3 Comparison of ZR content in anther at different development stage

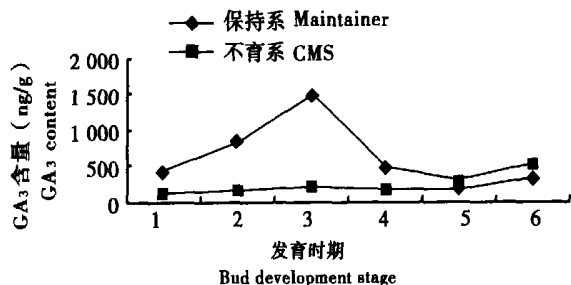


图 4 花药不同发育时期 GA₃含量

Fig 4 Comparison of GA₃ content in anther at different development stage

2.1.4 GA₃含量的动态变化 由图 4 可知,不育系和保持系花药发育过程中 GA₃含量的变化趋势不同,不育系在花药整个发育过程中一直缓慢上升,而保持系在花蕾长 1.0 mm 后迅速上升,在花蕾长 2.0~3.0 mm 时达到峰值,该时期不育系 GA₃含量显著低于保持系,保持系 GA₃含量是不育系的 6.56 倍。

在花药整个发育过程中,不育系 GA₃含量的变化不大,一直处于较低水平。不育系 GA₃含量显著低于保持系的时期正好是小孢子开始败育的时期,GA₃含量的亏缺可能进一步促进了小孢子败育的发生。

2.2 ZR/ABA 比值的动态变化

由图 5 可知,不育系 2002-640 及其保持系 2002-482 花药发育过程中 ZR/ABA 比值的变化不尽相同,在花药的整个发育过程中,不育系 ZR/ABA 比值的变化很小,而保持系呈先降后升又降的变化趋势。花蕾长 2.0 mm 以前,不育系和保持系的 ZR/ABA 比值没有差异;在花蕾长 2.0 mm 后,保持系的 ZR/ABA 比值迅速上升,在花蕾长 3.0~4.0 mm 时达峰值。不育系 ZR/ABA 比值显著低于保持系的时期正好是小孢子明显败育的时期。

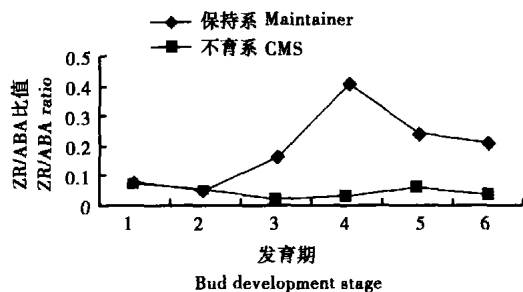


图 5 花药不同发育时期 ZR/ABA 比值

Fig 5 Comparison of ZR/ABA ratio in anther at different development stage

3 讨论

大量的研究表明,激素与植物性别的表达存在密切的关系。20 世纪 60~70 年代,人们应用外源激素诱发了一些植物产生雄性不育;70~90 年代,通过对一些材料内源激素分析,进一步揭示了雄性不育的发生涉及到内源激素的变化。目前,有关小孢子败育过程中激素调控作用及其机制等方面的研究资料尚不够深入和系统,然而一些学者的研究结果都表明了由小孢子败育导致的雄性不育与内源激素的变化有关^[1-3]。

3.1 激素含量与大白菜胞质雄性不育的关系

本研究结果表明在小孢子发育过程中,不育系花药 ABA 含量高于保持系,尤其在小孢子开始败育时期(花蕾长 2.0~3.0 mm),不育系的 ABA 含量显著高于保持系。这与 GMS^[1]和 CMS 油菜^[2]以及 K、T 型 CMS 小麦^[4]的结论一致。高含量的 ABA 可能导致通往花的维管束系统不能正常形成,小孢子发育所需的营养物质不能及时得到供应,小孢子发育

受到阻遏,小孢子内物质匮乏,最终导致了败育的发生。

IAA 含量高的组织和细胞是营养物质输入的“库”,IAA 在调节养分竞争方面起着重要的作用。大白菜新型胞质雄性不育材料在小孢子开始败育时,不育系花药内 IAA 亏缺可能使输入的营养物质不足,从而影响了小孢子的正常发育,引起败育,导致雄性不育^[5],由此认为,该时期不育系花药内 IAA 含量的短缺是引起大白菜雄性不育系小孢子败育的因素之一。在 CMS 玉米^[6]和小麦^[7]花药中也呈现 IAA 含量的降低。花蕾长 4.0 mm 后,不育系 IAA 含量又急剧上升,显著高于保持系(图 2),这与水稻不育系的结果相似,花药发育后期高浓度的 IAA 含量诱导乙烯的产生,抑制了花粉的正常发育,加速了花粉的败育^[8]。

赤霉素可以作为基因的解除抑制剂,可以明显改变碳水化合物的代谢过程,促进许多水解酶的活性,使贮存物水解,提供生长和发育所需能量。本研究表明在小孢子开始败育时,不育系花药 GA₃ 含量显著低于保持系,较低的 GA₃ 浓度不能提供花药正常发育所需要的多种水解酶,促进了小孢子败育的发生。唐祈林等^[9]在不同核背景的 CMS 玉米花药中也发现 GA₃ 含量的降低。因此,该时期 GA₃ 含量的严重亏缺是引起大白菜雄性不育系小孢子败育的又一原因。

与 IAA、GA₃ 趋势相同,在小孢子发育过程中,不育系花药 ZR 含量显著低于保持系。不育系 ZR 合成速度的降低或分解的加快,导致 ZR 含量不足,延迟了细胞的分裂或分化,从而导致小孢子的败育。这与夏玉先等^[10]在棉花的不育株中得出不育系花药 ZR 含量降低的结论相同。

3.2 ZR/ABA 比值与大白菜胞质雄性不育的关系

激素在花药组织中并不是孤立存在的,激素调控是以不同类型激素间相互作用为基础,它们以相互拮抗或协同的方式发挥作用。激素对基因的表达调控不仅取决于某种激素含量的增加或减少,更重要的是通过激素间平衡实现的^[11]。Poliwick 等^[12]在 CMS 油菜中发现,不育株的根、茎、叶中 CTK 含量低于可育株,ABA 含量高于可育株,并强调这两种生长调节物质的正常比例对正常的雄蕊发育非常重要。本研究结果发现,在小孢子开始败育时,不育系花药 ZR/ABA 的比值显著低于保持系,激素比例失调,激素平衡被破坏,这与 CMS 棉花^[10]情况相似。

由此认为,不育系花药发育过程中 ZR/ABA 比例失调,低的 ZR/ABA 比值影响了雄蕊的发育,导致大白菜雄性不育系小孢子的败育。

综上所述,白菜新型胞质雄性不育系在花药发育过程中,花蕾长 2~4 mm 的花药表现出 IAA、GA₃、ZR 三种促进生长发育的激素含量都显著低于保持系,而促进衰老的激素 ABA 却显著的高于保持系,认为这一时期 IAA、GA₃、ZR 的亏缺、ABA 的盈积、ZR/ABA 比例的失调是导致花粉败育的内在生理原因。

参考文献:

- [1] Shukla A, Sawheny V K. Absciscic acid: one of the factors affecting male sterility in *Brassica napus* [J]. *Physiol Plant*, 1994, 91: 522—528
- [2] 田长恩,张明永,段俊,等.油菜细胞质雄性不育系及其保持系不同发育阶段内源激素动态变化初探[J]. *中国农业科学*, 1998, 31 (94): 20—25
- [3] 李英贤,张爱民,梁振兴,等.小麦雄性不育的发生与花药组织内激素平衡的关系[J]. *农业生物技术学报*, 1998, 6 (1): 71—75
- [4] 李英贤,张爱民,黄铁成.小麦细胞质雄性不育与花药组织内源激素的关系[J]. *农业生物技术学报*, 1996, 4 (4): 307—313
- [5] 黄厚哲,楼仕林.植物生长素亏缺与雄性不育的发生[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1984, 23(1): 82—97
- [6] 夏涛,刘纪麟.生长素和细胞分裂素与玉米细胞质雄性不育关系的研究[J]. *作物学报*, 1994, 20 (1): 82—97
- [7] 张爱民,李英贤,黄铁成. T 型不育系、恢复系和杂种 F₁花药组织内源激素水平比较[J]. *农业生物技术学报*, 1997, 5 (3): 234—238
- [8] Perez A T, Chang T T. Induction of male-sterility in rice with ethrel and RH-531 [J]. *SABRAO Newsl*, 1973, 5(2): 133—139
- [9] 唐祈林,荣廷昭,胡长远.不同核背景的玉米 CMS 系内源激素关系研究[J]. *四川农业大学学报*, 2002, 20 (3): 209—211
- [10] 夏玉先,唐尚格.棉花 473A 育性表达中花药脱落酸和玉米素+玉米素核苷含量变化[J]. *棉花学报*, 1995, 7 (3): 169—171
- [11] 杨代常,朱英国,唐珞珈.四种内源激素在 HPGMR 叶片中的含量与育性转换[A]. 袁隆平.两系法杂交水稻研究论文集[C]. 北京:农业出版社, 1992 176—181
- [12] Polowick P L, Sawheny V K. Microsporogenesis in a normal line and in the Ogura cytoplasmic male-sterile line of *Brassica napus* [J]. *Sex plant Report*, 1990, 3: 263—276