

# 玉米细胞质雄性不育性与乙烯的关系

夏 涛

(厦门大学生物系, 厦门 361005)

刘纪麟

(华中农业大学农学系, 武汉 430070)

摘 要 研究了玉米 Mo17 核背景三种雄性不育细胞质(T、C、S)系及正常可育细胞质(N)系小孢子发育不同阶段花药组织的乙烯释放量, 发现不育系小孢子败育前的一、二个时期内花药组织乙烯释放量显著增加。同时设计的乙烯利及其合成抑制剂外源喷施实验也表明了其对雄性育性的逆转效应。讨论了植物激素对玉米细胞质雄性不育性的调控作用。

关键词 玉米 细胞质雄性不育性 乙烯

植物激素在植物组织内普遍存在。它是代谢反应的产物, 同时又能在从整体到分子的各个水平上调节植株的生命活动——生长和发育<sup>[1,2]</sup>。因此, 研究内源激素在玉米细胞质雄性不育性(Cytoplasmic Male Sterility, CMS)表达过程中的变化, 对于弄清激素在小孢子发生、败育中可能存在的作用及其机制, 对于认识玉米 CMS 的遗传机制和制定育性的人工调控措施都有着重要的意义。本研究选用 Mo17 核背景的同核异质系为材料, 在小孢子发育的各阶段, 研究不育细胞质系及其保持系花药组织内源乙烯的释放量, 以及乙烯利和乙烯合成抑制剂外源施用对育性的调控效应, 以期能为玉米 CMS 生化遗传机制及激素对雄性育性作用机制的认识提供帮助。

## 1. 材料和方法

### 1.1 试验材料

选用 Mo17 背景的同核异质系 Mo17cms—C、Mo17cms—T、Mo17cms—唐徐(S)及 Mo17(N)作为实验材料, 研究小孢子发生和败育过程中花药组织的乙烯释放量及其变化。

乙烯利及乙烯合成抑制剂外源施用实验, 分别选用(Mo17×77<sup>3</sup>)cms—T 以及(Mo17×予20<sup>5</sup>)cms—唐徐(S)作为不育材料, 恢复型杂交种 Mo17cms—唐徐(S)×HZ<sub>332</sub>, Mo17cms—C×H<sub>4525</sub>(3358<sub>1121</sub>)作为可育材料。

上述所有材料均由华中农大玉米室提供。各同核异质系均经过 5~6 代以上回交选育并表现稳定, 各杂交种在本校试验田配制。

### 1.2 内源乙烯释放量的测定

花药组织内源乙烯释放量的测定采用气相色谱法进行<sup>[4,5]</sup>。于正午(田间温度 32 ±)取

回玉米雄穗, 按不同时期称重后迅速投入 50ml 三角瓶中, 加入少量水(2ml) 保持湿润、密封。在  $27.5 \pm 0.5$  温度下放置黑暗处, 后测定。

采用 Shimadzu GC-9A 气相色谱仪测定。色谱柱填料为 GDX502(60~80 目), 柱高为 1m, 直径 3mm。检测器为 FID, 灵敏度为  $RANGE 10^2$ 。载气为  $N_2$ , 流速 39ml/min。空气的流速为 500ml/min( $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ ),  $H_2$  的流速为 50ml/min( $0.6\text{kg}/\text{cm}^2$ )。柱温 60, 进样口温度 100。

使用  $10 \times 10^{-6}$  标准乙烯为对照, 进样量 1ml。样品的进样量为 2ml。以保留时间( $t_R$ ) 和共同色谱法定性, 用外标法以峰高值定量。

### 1.3 乙烯利及乙烯生物合成抑制剂外源喷施

从拔节期开始对不育系、保持系、恢复型杂交种等试验材料进行不同浓度的乙烯利( $\alpha$ -氯乙基膦酸, 2-chloroethyl-phosphonic) 和乙烯生物合成抑制剂氯化钴( $CoCl_2$ ) 的外源喷施实验。15~20ml/次·株, 4~5 天/次, 喷施至叶面和喇叭口。T、C 型材料, 喷施实验进行到单核小孢子中期。而 S 型材料, 保持系及恢复型杂交种则进行至二核花粉期。

在雄穗发育的最后阶段取主轴上、中、下三个部位及侧轴的小穗固定于 FAA 液中, 每个材料取 8 朵小花(每一部位各 2 朵), 每朵小花内 2 枚花药, 剥取花药内的全部花粉进行 I-KI 染色反应的观察, 每枚花药观察 6~8 个视野。统计可染、半可染及不可染花粉粒的数目, 以此计算可育率和不育率, 从而评估植物激素外源施用对玉米雄性育性的调控效应。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米 CMS 系及其保持系小孢子发育不同阶段花药组织乙烯释放量

使用气相色谱仪分析测定了 Mo17(N、T、C、S) 四种材料小孢子发育不同阶段花药组织的乙烯释放量, 所得结果如表 1 所示。

从实验结果不难看出, 在 Mo17cms-C、T 小孢子败育前期的减数分裂期中, 花药组织乙烯释放量显著高于同期正常保持系 Mo17(N), 是其 3~4 倍; Mo17cms-唐徐(S) 在小孢子败育前期的单核早期, 花药组织的乙烯释放量高于同期正常保持系 Mo17(N) 近 2 倍。这些现象表明, 雄性不育细胞质材料小孢子败育前一、二个时期花药组织乙烯含量的急剧增加可能与随后时期小孢子的开始败育有关。

从表 1 中还可以看出, 三种不育细胞质系在整个小孢子发生和败育过程中花药组织乙烯释放量的变化趋势与正常胞质系相反。正常保持系 Mo17(N) 从减数分裂期开始, 随着小孢子发育的推进, 花药组织乙烯释放量逐渐增加; 而三种雄性不育细胞质(T、C、S) 系在败育前期败育发生期 完全败育期的过程中, 其花药组织乙烯释放量却逐渐降低。

### 2.2 乙烯利外源施用对正常保持系和恢复型杂交种雄性育性的影响

由于发现在小孢子发育过程中正常保持系花药乙烯释放量显著低于不育胞质系(表 1), 因此我们选择一些正常可育材料, 从小孢子发育早期起外源喷施乙烯利, 通过花粉染色反应的镜检研究其雄性育性的变化, 以此评价外源施用的调节效应。从表 2 中可见, 乙烯利的外源喷施可以诱导小孢子及花粉的败育。当施以  $5000 \times 10^{-6}$  乙烯利时, 唐徐 Mo17 $\times$ HZ<sub>332</sub>、Mo17(N) 的不育率分别达到 99.25% 和 50.85%, 即相当于全不育和半不育, 诱导效应相当显著。施以

6000 × 10<sup>-6</sup> 乙烯利时, Mo17—C × H<sub>4525</sub> 的不育率达 55.22%。

表 1 Mo17(N、T、C、S) 小孢子发育不同阶段花药组织乙烯释放量(nl/g·h)

材 料	小孢子发育时期	乙烯释放量
No17(N)	减数分裂	2.7397 ± 0.0775
	单核早期	4.2149 ± 0.1032
	单核中晚期	5.6236 ± 0.2161
	二核花粉	5.8708 ± 0.3834
Mo17cms—C	减数分裂	8.1213 ± 0.1646
	单核早期	3.4703 ± 0.4151
	单核中期	2.9505 ± 0.2919
Mo17cms—T	减数分裂	11.5459 ± 2.0782
	单核早期	4.3836 ± 0.0837
	单核中期	1.0959 ± 0.2444
Mo17cms—唐徐(S)	单核早期	7.8278 ± 1.0297
	单核中晚期	4.2922 ± 0.4275
	二核花粉	4.1538 ± 0.0682

表 2 乙烯利外源施用对保持系、恢复型  
杂交种育性的影响\*

材 料	不育率(%)				
	对照	乙烯利(×10 <sup>-6</sup> )			
		1000	4000	5000	6000
Mo17cms—唐徐 × HZ <sub>332</sub>	42.87	65.48		99.25	
Mo17(N)	1.05			50.85	
Mo17cms—C × H <sub>4525</sub>	1.42	27.17	28.06		55.22
Mo17cms—C × 3358 <sub>1121</sub>	1.30	6.32			

\* 从拔节期至二核期喷施 3~4 次, 每次 15~20ml/株, 喷施叶面  
和喇叭口; 每枝花药观察 6~10 个视野(2000 以上花粉粒)。

表 3 CoCl<sub>2</sub> 外源施用对不育系育性的影响\*

材 料	可育率(%)		
	对照	CoCl <sub>2</sub> (×10 <sup>-6</sup> )	
		500	600 1000
Mo17cms—唐徐(S)	0	0.95	
(Mo17 × 77 <sup>3</sup> ) cms—T	0	0	0**
(Mo17 × 予 20 <sup>5</sup> ) cms—唐徐(S)	0		0.297

\* 从拔节期至二核期(T 型材料对照其保持系) 喷施 3~  
4 次。每枝花药观察 6~10 个视野。

\*\* 250 ± 小孢子/枚花药发育至单核晚期——二核花  
粉期败育。

2.3 乙烯生物合成抑制剂 CoCl<sub>2</sub> 外源施用对不育系雄性育性的影响

以几种不育细胞质系为材料, 在小孢子发育的早期喷施乙烯生物合成抑制剂 CoCl<sub>2</sub>, 试图抑制不育系花药组织在败育前期内源乙烯的大量合成和释放, 并通过花粉染色反应的镜检, 研究这种抑制效应及其对育性的影响。所得结果如表 3 所示。

细胞学研究发现<sup>[3,6]</sup>, T 型雄性不育细胞质系小孢子发育在减数分裂期出现超微结构的异常, 单核早期可以观察到小孢子败育的发生, 至单核中期则完全败育; 而 S 型雄性不育细胞质系的败育出现在二核花粉期, 并在该期完全败育。从表 3 可见, 对于在小孢子早、中期即发生败育的 T 型不育系材料, 外源喷施乙烯生物合成抑制剂 CoCl<sub>2</sub> 对育性的恢复几无效应, 但可以使花药内的部分小孢子继续发育 1~3 个阶段, 推迟到单核晚期和二核花粉期败育。而对于在二核花粉期败育的唐徐(S) 型雄性不育材料, 外源施用乙烯生物合成抑制剂 CoCl<sub>2</sub> 能够使不育系产生少量可育花粉。虽然从大田和生产角度而言, 在本实验处理范围内这种效应几可忽略, 但它仍然说明了外源喷施 CoCl<sub>2</sub> 以抑制不育系花药组织乙烯的过量合成能够使不育性发生逆

转。因此也表明了激素在玉米小孢子发生及败育过程中的重要作用。

### 3 讨论

目前有关小孢子发生和败育过程中激素的调控作用及其机制等方面的研究资料尚不够深入和系统,有关玉米 CMS 与内源激素含量关系的研究也尚未见到报道。

在本项研究中我们发现,玉米 Mo17 背景三种雄性不育细胞质(T、C、S)系败育发生前的 1~2 个时期内花药组织乙烯含量显著高于其正常保持系 Mo17(N);而当不育细胞质系开始败育和完全败育时,其花药组织乙烯含量则显著下降并低于正常保持系。另一项在湖北光敏感核不育水稻(HPGMR)中的研究也发现,HPGMR 系幼穗中释放的乙烯在长日不育条件下比对照高 2.5~5.0 倍<sup>[5]</sup>。这些研究都表明,乙烯在雄性不育的表达和实现进程中起着重要的调节作用。

另一方面,关于外源施用乙烯对雄性育性的转变作用也有许多报道。在水稻<sup>[7,8]</sup>、小麦<sup>[9]</sup>中都发现在小孢子发育的一定时期内外源施用一定浓度的乙烯利能诱导花粉的高度不育。用乙烯生物合成抑制剂 CoCl<sub>2</sub> 处理幼穗,可以在长日不育条件下诱导 HPGMR 花粉可育<sup>[5]</sup>。本研究也发现,乙烯利可以诱导玉米正常可育材料花粉的不育,CoCl<sub>2</sub> 的外源施用对玉米细胞质雄性不育性也有一定的“拯救效应”。这些研究资料从另一个角度说明了乙烯对雄性育性的调控效应。

一般认为,乙烯对生长素的移动具有抑制作用,同时它能导致生长素总量的减少,即乙烯能够抑制生长素的合成和运输<sup>[10]</sup>。由于有许多报道指出,在乙烯作用下,过氧化物酶(POX)及 IAA 氧化酶活性显著增加<sup>[10]</sup>,而这两种酶对组织内 IAA 都有显著的氧化作用,因而推测乙烯对生长素的抑制效应是通过 POX 和 IAA 氧化酶来实现的。在我们对玉米 CMS 系小孢子发生、发育过程中花药组织 POX 和 IAA 氧化酶活性的测定中,也都发现其在不育系花药组织中的显著增高<sup>[11]</sup>。事实上,在我们另一项使用高效液相色谱(HPLC)技术对 Mo17 核背景三种不育细胞质(T、C、S)系及其保持系小孢子发育过程中花药组织 IAA 含量的研究中,也的确发现了不育系花药组织内源 IAA 含量的显著降低<sup>[12]</sup>。综合以上几方面的研究结果我们认为,在玉米 CMS 小孢子发生和败育过程中,乙烯和生长素这两类激素是协同作用的。

本研究初步表明了玉米细胞质雄性不育性与植物激素之间存在着某种关联。而在 CMS 的表达与实现过程中,包括乙烯在内的植物激素对 CMS 的可能的调控及其这种调控的分子机制,有待于进一步的研究<sup>[12,13]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Chailakhyan MK. Genetic and hormonal regulation of growth, flowering and sex expression in plants. Amer J Bot, 1979, 66(6): 717-736
- 2 MacMillan J. Hormonal regulation of development I. Molecular aspects of plant hormones. In: Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, 1986, Vol. 9
- 3 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

- 4 聂先舟, 刘道宏等. 乙烯在离体水稻叶片衰老中的作用. 华中农业大学学报, 1989, 8(3): 218~222
- 5 骆炳山, 李文斌等. 湖北光敏感核不育水稻育性转换机理初探. 华中农业大学学报, 1990, 9(1): 7~12
- 6 夏涛, 刘纪麟等. 玉米同核异质雄性不育花药发育的超微结构研究. 华中农业大学学报, 1993, 12(3): 221~224
- 7 王熹, 阙瑞芬. 乙烯及配子诱杀剂对水稻花粉不育的诱导. 植物生理学报, 1981, 7(4): 381~383
- 8 Perez AT, Chang TT et al. Induction of male-sterility in rice with ethrel and RH-531. SABRAO News1, 1973, 5(2): 133- 139
- 9 谢学民, 张全德等. 化学药剂诱导雄性不育的效果和生理效应. 浙江农业大学学报, 1995, 11(1): 41~47
- 10 高景辉. 植物荷尔蒙. 台北: 华香园出版社, 1985
- 11 夏涛, 刘纪麟. 玉米雄性不育细胞质保护酶系统的研究. 见: 福建省科协首届青年学术年会论文集. 福州: 福建科学技术出版社, 1992, 71~75
- 12 夏涛, 刘纪麟. 生长素和玉米素与玉米细胞质雄性不育性关系的研究. 作物学报, 1994, 17(1): 27~32
- 13 夏涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育性(CMS)的激素调控机制. 北京农业大学学报, 1993, 12(增刊): 17~22

## Relation between Ethylene and Cytoplasmic Male Sterility in Maize (*Zea mays* L.)

Xia Tao

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Liu Jiin

(Department of Agronomy, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** The contents of anther-released ethylene of isonuclear alloplasmic lines on Mo17 nuclear background with three male-sterile cytoplasm T, C, Tang Xu(S) and normal cytoplasm (N) line during the stage of microsporogenesis and development were studied. It was found that at the 1- 2 stage(s) before the microspore abortion happened, the released ethylene contents from male-sterile anthers were significantly higher than that from normal cytoplasm line. The study of exogenous application of plant growth substances demonstrated that ethrel could remarkably induce the abortion of microspore and pollen of male-fertile materials. It was also found that the abortion stage of male-sterile lines was partially delayed by the external application of  $\text{CoCl}_2$  which is a kind of inhibitor of ethylene synthesis. The possible regulatory role of ethylene on CMS in maize was also discussed.

**Key words:** Maize; Cytoplasmic male sterility (CMS); Ethylene