

洋葱胞质雄性不育系及其保持系花蕾内源激素含量和脯氨酸含量的动态变化特征

曾爱松¹ 梁毅² 严继勇¹ 李健琦¹ 宋立晓¹ 高兵¹

(1. 江苏省农业科学院 蔬菜研究所, 江苏 南京 210014; 2. 北京农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘要:以洋葱胞质雄性不育系 63A 及其同核异质保持系 63B 为试材,研究了花蕾发育过程中 IAA、GA₃、ZR、ABA 含量以及脯氨酸含量的动态变化规律,探讨洋葱不育性与内源激素、脯氨酸含量的关系。结果显示,洋葱不育系花蕾的 IAA、GA₃、ZR 和脯氨酸含量在败育过程中显著低于保持系,而 ABA 含量则较保持系有不同程度的盈积。且在花药的发育过程中,二者的差异主要发生在单核期,即不育系小孢子败育的主要时期。据此认为,IAA、GA₃、ZR、ABA 和脯氨酸含量的异常与洋葱雄性不育的发生有关。

关键词:洋葱; 雄性不育; 内源激素; 脯氨酸

中图分类号: S633.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0077-04

Dynamic Changes of Endogenous Hormones and Free Proline in Cytoplasmic Male Sterile Lines and Maintainer Lines of Onion (*Allium cepa* L.)

ZENG Ai-song¹, LIANG Yi², YAN Ji-yong¹, LI Jian-qi¹, SONG Li-xiao¹, GAO Bing¹

(1. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: Onion (*Allium cepa* L.) buds of cytoplasmic male-sterile (CMS) line and its maintainer line at different developmental stages were employed as experimental materials to reveal relationships between CMS and changes of endogenous hormone and proline contents by measuring IAA, GA₃, ZR, ABA and free proline contents. The results showed that in course of abortion, sterile buds were lower significantly in IAA, GA₃, ZR and free proline contents, while higher in ABA contents. In anthers development stages, the difference happened mainly in the main pollen abortion stage (monokaryophase). It is suggested that the contents of IAA, GA₃, ZR, ABA, and free proline may be related with the occurrence of male-sterile onion.

Key words: Onion; Male sterile; Endogenous hormone; Proline

洋葱(*Allium cepa* L.) 又名玉葱、圆葱、葱头等,为百合科葱属三年生植物,是我国主要的内销和出口创汇蔬菜。洋葱为异花授粉作物,由于花器官很小,难以开展常规人工控制杂交育种。因此,选育并利用洋葱雄性不育系配制杂交种一直受到蔬菜育种工作者的高度重视。随着杂种优势在作物育种上的广泛应用,国内外对植物雄性不育机理的研究越来越深入。但是,中国洋葱杂种优势的育种工作起步很晚加上洋葱生长周期长,且研究力量薄弱,有关洋

葱雄性不育机理的基础研究相对滞后。植物激素对雄性不育的发生起着重要的调节作用^[1]。研究认为雄性不育的控制可能是在花和雄蕊的发育过程中改变了内源激素的平衡,花粉粒内壁结构异常、能量亏缺和物质代谢紊乱,导致作物雄性不育^[2-5]。国内外对于洋葱 CMS 与内源激素、脯氨酸的关系研究尚未见报道。本试验以本课题组选育的洋葱细胞质雄性不育系 63A 及其相应的保持系 63B 为材料,通过对不同发育时期花蕾的内源 IAA、GA₃、ZR 和

收稿日期: 2012-08-01

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(200903018)

作者简介: 曾爱松(1977-),女,山东菏泽人,助理研究员,硕士,主要从事洋葱、甘蓝遗传与生物技术育种研究。

通讯作者: 严继勇(1963-),男,江苏姜堰人,研究员,博士,主要从事甘蓝、洋葱遗传育种研究。

梁毅(1969-),男,河南罗山人,副研究员,硕士,主要从事洋葱与胡萝卜遗传育种研究。

ABA 的含量及脯氨酸含量进行动态变化分析,以期揭示洋葱雄性不育激素和脯氨酸调控机理,对促进雄性不育系在洋葱杂种优势中的利用具有重要的理论和实践意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为洋葱细胞质雄性不育系 63A 及其同核异质保持系 63B,由江苏省农业科学院蔬菜研究所选育而成。

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验设计 2010 年 9 月 25 日播种,每系群体 300 株,田间管理同大田。2011 年 9 月 30 日各系选择大小相近鳞茎各 200 株定植于大棚。

1.2.2 取样 现蕾后选择长势和发育水平相近植株取其花序相同部位花蕾用于各项生理指标测定。通过形态学观察和细胞学镜检分别采集不育系(63A)及其保持系(63B)造孢细胞期(I)、小孢子母细胞期(II)、二分、四分小孢子期(III)、单核小孢子期(IV)、花粉粒成熟期(V)和初花期(VI)6个发育时期。上述各期样品取样后置冰壶保存,及时带回实验室内鲜样称质量后装袋密封,经液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱中备用。

1.2.3 激素含量测定 IAA、 GA_3 、ZR 和 ABA 含量采用间接酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assays,简称 ELISA)测定。取保存样品各 1 g,经 80% 预冷甲醇(内含 1 mmol/L BHT)冰浴研磨成匀浆后 4°C 下提取 4 h,4 000 r/min 离心 15 min 取上清。上清液经浓缩干燥、稀释后用于 ELISA 测定。酶标仪的型号为 Thermo Multiskan MK3,试剂盒由中国农业大学农学与生物技术学院化控研究室提供^[6]。

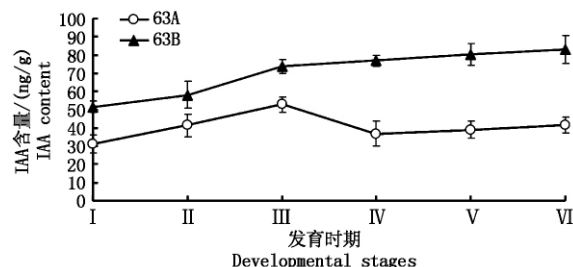
1.2.4 脯氨酸含量测定 脯氨酸含量的测定参照张志良^[7]的方法进行,仅样品液的提取略作修改。取 0.5 g 左右花蕾,分 3 次共加入 5 mL 乙醇研磨至匀浆,转入 20 mL 刻度试管,加水至刻度处,于 80°C 水浴中加热 20 min,稍冷后分别加入约 0.2 g 的人造沸石和活性炭,摇匀,静置 10 min 后过滤至三角瓶中,然后取样测定。

2 结果与分析

2.1 洋葱胞质不育系和保持系不同发育时期 IAA 含量动态变化

由图 1 可见,保持系各个时期花蕾中的 IAA 含量均高于不育系。其中,不育系和保持系花蕾中

IAA 含量在四分体小孢子期前随着小孢子发育均呈快速上升趋势。花粉母细胞减数分裂期小孢子自身的物质代谢和合成十分旺盛,需要大量物质和能量,为满足这一需要,花药中 IAA 含量从而相应地剧烈增加。在此之后,保持系持续增加,至花粉粒成熟期达到最大值。而不育系在四分体时期出现转折,即不育系开始剧烈下降,至单核小孢子期下降到最低值。此后,不育系花蕾中 IAA 含量保持上升。在小孢子单核期至初花期,保持系中 IAA 含量分别为不育系的 2.08 倍、2.07 倍和 1.98 倍,差异显著($P < 0.05$)。



63A. 不育系; 63B. 保持系; I. 造孢细胞期; II. 小孢子母细胞期; III. 二分、四分体时期; IV. 单核小孢子期; V. 花粉成熟期; VI. 初花期; 图 2~5 同。

63A. CMS line; 63B. Maintainer line; I. Sporogenous cells stage; II. Pollen mother cell stage; III. Tetrads stage; IV. The uninucleate pollen grain stage; V. Mature pollen grain stage; VI. Initial-flower stage; The same as Fig. 2~5.

图 1 洋葱不育系和保持系花蕾 IAA 含量的动态变化(以鲜质量计)

Fig. 1 Change of IAA content in buds of onion sterile line and its maintainer line

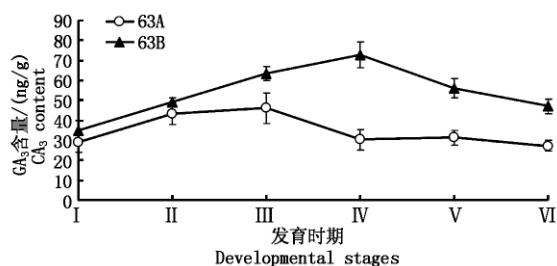


图 2 洋葱不育系和保持系花蕾 GA_3 含量的动态变化(以鲜质量计)

Fig. 2 Change of GA_3 content in buds of onion sterile line and its maintainer line

2.2 洋葱胞质不育系和保持系不同发育时期 GA_3 含量动态变化

图 2 显示花蕾发育的各个时期,保持系的 GA_3 含量要高于不育系。其中,保持系随着花蕾发育, GA_3 含量呈抛物线形变化,其峰值出现在单核小孢子期,此期 GA_3 含量与造孢细胞期相比增加了 108.2%;而不育系此期 GA_3 含量却几乎是整个花蕾发育期的最低值。在单核小孢子期,保持系 GA_3 含量为不育系的 2.41 倍,差异达显著水平($P < 0.05$)。保持系在高含量 GA 的影响下,花药组织呼吸加强,同化物运输加速,使花粉内积累足够的物质与能量,保

证其发育。

2.3 洋葱胞质不育系和保持系不同发育时期 ZR 含量动态变化

两系花蕾 ZR 含量变化规律显著不同,但保持系始终高于同期的不育系。于四分小孢子之前不育系 ZR 含量持续增加,而保持系则呈下降趋势。此后,二者在单核小孢子期都达到最低值。单核小孢子期后,保持系 ZR 含量呈先增加后降低的变化趋势,不育系则呈持续增加的变化趋势(图 3)。两系比较,不同发育时期保持系 ZR 含量分别是不育系的 108.4% ~ 161.6% 不等,表明保持系 ZR 含量较不育系有明显盈余。

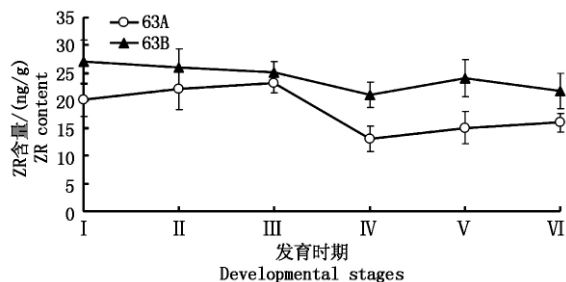


图3 洋葱不育系和保持系花蕾 ZR 含量的动态变化(以鲜质量计)

Fig. 3 Change of ZR content in buds of onion sterile line and its maintainer line

2.4 洋葱胞质不育系和保持系不同发育时期 ABA 含量动态变化

图4的结果表明,在整个花蕾发育过程中,不育系花蕾中 ABA 含量均高于保持系。其中保持系花蕾 ABA 含量变化表现为单峰曲线,除单核小孢子期较低以外,在其余4个发育时期没有显著差异($P > 0.05$)。不育系 ABA 含量则呈低-高-低-高的变化趋势,其中在单核小孢子期达到最高值。不育系 ABA 含量在不同时期均高于保持系,含量是保持系 111.7% ~ 144.5% 不等,其中单核小孢子期差异显著($P < 0.05$)。

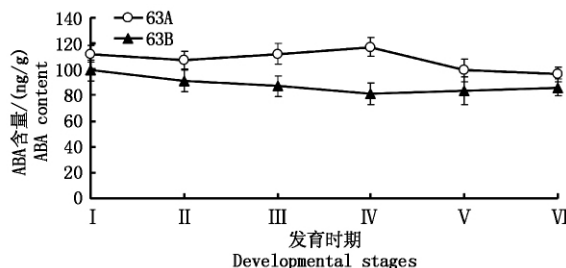


图4 洋葱不育系和保持系花蕾 ABA 含量的动态变化(以鲜质量计)

Fig. 4 Change of ABA content in buds of onion sterile line and its maintainer line

2.5 洋葱胞质不育系和保持系不同发育时期脯氨酸含量动态变化

从图5可以看出,在花蕾发育的各个时期,两系

的游离脯氨酸含量都呈持续增加的动态变化,其中各个发育阶段不育系的游离脯氨酸含量均低于保持系。在单核小孢子期前阶段不育系与保持系非常接近,但随着花蕾的生长发育,不育系的脯氨酸含量略有增加,而保持系花蕾脯氨酸含量呈快速上升趋势。在花粉粒成熟期和初花期保持系约为不育系花蕾的 1.53 倍和 1.64 倍。

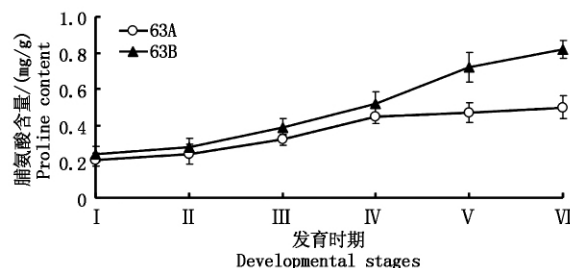


图5 洋葱不育系和保持系花蕾脯氨酸含量动态的变化(以鲜质量计)

Fig. 5 Change of free proline content in buds of onion sterile line and its maintainer line

3 讨论

有关植物雄性不育与内源激素含量的关系,前人进行了较多研究。Sawhney 等总结了作物中植物雄性不育与内源激素的研究后指出:生长素含量的增加、乙烯的过度产生、ABA 水平的提高以及赤霉素和细胞分裂素含量的降低将导致多数植物产生雄性不育^[2]。到目前为止,这一推论在很多作物的雄性不育与内源激素含量的研究中得到了证实^[8-10]。但是,也有很多截然相反的结论。例如,在葱、紫菜薹、亚麻上均发现雄性不育与 IAA 的亏损^[3, 11-12]有关。尽管结论不尽一致,但在研究作物雄性不育发生过程与内源激素含量的关系中,均发现激素代谢异常的现象,说明激素的动态变化与雄性不育的发生有着密切的联系。

本试验所测4种内源激素中,洋葱不育系花蕾败育过程中 IAA、GA₃ 和 ZR 含量较保持系显著亏缺,ABA 含量则不同程度地增加,表明不育系花蕾发育过程中 IAA、GA₃ 和 ZR 的降低,ABA 含量的提高可能导致洋葱雄性不育的发生。而且,不育系花蕾中 IAA、GA₃ 和 ZR 含量均在单胞花粉粒时期出现最低值拐点,其 ABA 含量在此时期出现最高值拐点。我们前期对洋葱雄性不育材料 63A 小孢子败育进行的细胞学研究发现:雄性不育材料 63A 的小孢子在四分体时期以前与可育材料无差别,都能形成四分体;其败育发生在单胞花粉粒时期,小孢子的细胞质被降解成空壳,染色浅,缺乏营养物质而败育^[13]。这表明内源激素含量的动态变化与细胞学

观察的试验结果具有统一性 相辅相成。

本试验中保持系各个时期花蕾中的 IAA 含量均高于不育系。现已证实 IAA 大多集中于生长旺盛的器官和组织内,IAA 可促进植物维管束发育,对细胞的分裂和生长、物质的运输和积累起重要作用^[2]。IAA 的亏缺将造成花粉粒形成和发育中的物质匮乏,从而影响花粉发育,导致败育产生不育^[14]。其中不育系和保持系花药中 IAA 含量变化在二分体、四分体小孢子期出现转折,即可育的保持系迅速增加,而不育系开始迅速下降,至单核小孢子期即小孢子败育的时期下降到最低值;此期间花药中 IAA 的迅速下降会降低花粉获取营养的能力,从而导致了花粉的败育。

在整个花蕾发育过程中,洋葱不育系花蕾中 ABA 含量均高于保持系。ABA 的盈积在所有雄性不育的植物中具有普遍性,据此认为洋葱的雄性不育的启动可能与高含量 ABA 有关。ABA 是参与调节 IAA 的代谢途径的。它可促进结合态 IAA 的形成和提高 IAA 氧化酶及过氧化酶的活性,从而降低游离态的 IAA 含量。IAA 含量的降低导致通往小花的维管系统不能正常形成,小孢子发育所需的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。因此,ABA 与 IAA 在雄性不育的发生中可能是以相互拮抗的方式起作用的^[15]。

本试验中,赤霉素和细胞分裂素含量的降低与洋葱雄性不育有关,这与 Sawhney 的推论相一致^[2]。GAs 有促进 IAA 生物合成的作用^[16-18]。GA₃ 可以通过调节 IAA 来实现对育性的调控^[12]。在单核期不育系的小孢子已败育,不再需要物质与能量,因此这一时期的低 GA 与 IAA 含量可能是花药败育的结果。ZR 为玉米素核苷,是活性很高的天然细胞分裂素。有研究指出,不育系花药组织中较高含量的玉米素类物质主要是通过抑制或阻止抗氰呼吸途径或部分抑制细胞色素途径而降低了花药的总呼吸强度,能量合成和供应减少,最终导致小孢子败育和雄性不育的发生^[19]。

不育系的花器官中游离脯氨酸含量比保持系亏缺是一个普遍现象。在甜菜、番茄、辣椒、萝卜、水稻、高粱、小麦、玉米等不育系花药中均发现严重缺乏游离脯氨酸的积累,比可育花低得多^[20-21]。游离脯氨酸在小孢子的发育过程中有重要的生理功能,能为花粉的萌发和花粉管的伸长提供重要的能源和氮源。本研究结果表明,从花粉母细胞到单核小孢子的关键期,不育系和保持系花蕾内脯氨酸都持续

增高,而不育系花药内的脯氨酸则显得很不足,这必然给新陈代谢造成不利影响,使小孢子败育。

综上所述,在洋葱花蕾发育的生殖生长过程中,雄性不育系与保持系材料的内源激素含量及脯氨酸含量存在差异,说明它们的异常均可能与洋葱雄性不育的发生有关。但激素及脯氨酸在洋葱雄性器官败育过程中对育性基因的调控机制仍需进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 黄厚哲,楼士林,王候聪,等.植物生长素亏损与雄性不育的发生[J].厦门大学学报:自然科学版,1984,32(1):466-477.
- [2] Sawhney V K, Shukla A. Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved [J]. American Journal of Botany, 1994, 81(12): 1640-1647.
- [3] 苗锦山,杨文才,刘彩霞,等.葱胞质雄性不育花蕾生化物质含量和能量代谢酶活性的动态变化特征[J].西北植物学报,2010,30(6):1142-1148.
- [4] 姚雅琴,张改生,刘宏伟,等.K型小麦花粉粒内壁及ATP酶活性与雄性不育的相关性[J].西北植物学报,2002,22(2):333-337.
- [5] 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[J].园艺学报,2000,27(3):187-192.
- [6] 何钟佩.农作物化学控制实验指导[M].北京:北京农业大学出版社,1993:60-68.
- [7] 张志良.植物生理学实验指导[M].2版.北京:高等教育出版社,1990.
- [8] 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(1):20-25.
- [9] Singh S, Sawhney V K. Cytokinins and abscisic acid in roots of the stamenless-mutant of tomato [J]. Reports of the Tomato Genetics Cooperative, 1992, 42: 34-35.
- [10] 吴智明,胡开林,符积钦,等.辣椒胞质雄性不育与花蕾内源激素含量的关系[J].华南农业大学学报,2010,31(2):1-4.
- [11] 许明,白明义,魏毓棠.紫菜薹细胞质雄性不育系及其保持系在不同发育时期内源激素的变化[J].西北农业学报,2007,16(3):124-127,135.
- [12] 关天霞,党占海,张建平,等.亚麻温敏型雄性不育系POD活性和内源激素含量比较分析[J].甘肃农业大学学报,2007,42(4):66-70.
- [13] 李园园,杨清,严继勇,等.洋葱63A细胞质雄性不育与绒毡层的提早衰退有关[J].作物学报,2006,32(3):369-372.
- [14] 赵玉锦,童哲,陈华君,等.内源植物激素与光敏核不育水稻农垦58S育性的关系[J].植物学报,1996,38(12):936-941.
- [15] 李宗鑫,周燮.植物激素及其免疫检测技术[M].南京:江苏科技出版社,1996.
- [16] Gaspar T, Kevers C, Panel C, et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1996, 32: 272-289.
- [17] 余叔文,汤章城.植物生理与分子生物学[M].北京:科学出版社,2003.
- [18] 樊卫国,安华明,刘国琴,等.刺梨果实与种子内源激素含量变化及其与果实发育的关系[J].中国农业科学,2004,37(5):728-733.
- [19] Miller C O. Possible regulatory roles of cytokinins [J]. Plant Physiology, 1985, 79: 908-910.
- [20] 刘忠松,官春云,陈社员.植物雄性不育机理的研究及应用[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [21] Kaul M L. Male sterility in higher plants [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1988.