

水稻细胞质雄性不育系及其保持系幼穗 发育过程中内源激素的变化

田长恩 段俊 梁承邨 黄毓文 刘鸿先

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 利用酶联免疫测定技术研究了水稻细胞质雄性不育系珍汕 97A 及其保持系珍汕 97B 在幼穗发育过程中叶片、幼穗和花药中内源 IAA、 GA_{1+4} 、ABA 和 iPAs 含量的动态变化。结果表明, 1) 从幼穗发育的雌雄蕊形成期到三核花粉期, 保持系叶片中 IAA 水平高于不育系, 并在二核花粉期最高; 在幼穗和花药中也以保持系为高。2) 保持系与不育系叶片中 GA_{1+4} 含量变化趋势相似, 均为先升后降, 但从单核到三核花粉期以保持系为高; 在幼穗和花药中也都以保持系为高。3) 不育系叶片中 ABA 水平在幼穗发育早期明显高于保持系, 中期与保持系相近, 后期又高于保持系; 在幼穗和花药中也都以不育系为高。4) 保持系叶片、幼穗和花药中 iPAs 含量始终显著高于不育系。5) 保持系叶片中 IAA+ GA_{1+4} +iPAs 与 ABA 之比值也始终高于不育系。提示不育系叶片、幼穗和花药中 IAA、 GA_{1+4} 、iPAs 和 ABA 含量出现了异常, 且 IAA、 GA_{1+4} 和 iPAs 亏缺以及 ABA 盈积可能与水稻细胞质雄性不育发生有关。

关键词 细胞质雄性不育; 植物激素; 水稻

分类号 Q946.88

CHANGES IN PHYTOHORMONES IN CYTOPLASMIC MALE STERILE RICE AND ITS MAINTAINER LINE DURING PANICLE DEVELOPMENT

Tian Chang'en Duan Jun Liang Chengye Huang Yuwen Liu Hongxian

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Contents of IAA, GA_{1+4} , ABA and iPAs were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in leaves, panicles and anthers of cytoplasmic male sterile (CMS) rice Zhenshan 97A and its maintainer Zhenshan 97B during panicle development. From stamen and pistil formation to trinucleate pollen stages, IAA content in leaves of CMS line was shown to be lower than that of maintainer line, and the highest level was observed at binucleate pollen stage in maintainer line. So were IAA contents in anthers and panicles. Changes in GA_{1+4} content in leaves of CMS and maintainer lines had a

广东省自然科学基金资助项目

本所朱西儒先生提供酶联免疫测定仪, 张海保先生协助测定, 特此致谢。

缩写 Abbreviations: IAA—吲哚乙酸 Indole-3-acetic acid; GAs—赤霉素类 Gibberellic acid group; ABA—脱落酸 Abscisic acid; iPAs—异戊烯基腺苷类 Isopentenyladenosine group.

1997-05-26 收稿; 1997-09-18 修回

similar pattern, i.e. in both lines, the level of GA_{1+4} rose at first, then dropped, however, the highest levels were found in leaves as well as in panicles and anthers of maintainer line during uninucleate to trinucleate stages. ABA level in leaves of CMS line were obviously higher than that in maintainer one at early panicle developmental stage, and was at nearly the same level in both lines at middle stage, then again still higher than that in maintainer line. The levels of ABA in panicles and anthers in CMS line were also higher than those in maintainer line. As to the contents of iPAs in leaves, panicles and anthers, markedly lower level in CMS line than in maintainer line was found at all stages. The ratios of $IAA+GA_{1+4}+iPAs$ to ABA in leaves, panicles and anthers of CMS line were also lower than those in maintainer one. It is proposed that the changes in contents of these phytohormones in CMS line are abnormal, and IAA, GA_{1+4} and iPAs deficiency and ABA accumulation might be related to the generation of CMS in rice.

key words Cytoplasmic male sterility; Phytohormones; *Oryza sativa* L.

众所周知, 植物激素对植物生长发育的全过程都有调节作用。业已发现, 植物雄性不育系的营养或生殖器官中内源激素含量与保持系的不同^[1], 并且在少数试材上发现, 雄性不育的发生伴有内源激素的变化^[2]。但是, 以往的研究所测定的激素种类单一或偏少; 或只静态比较某一特定时期不育系与保持系内源激素的差异; 或只注重对生殖器官的研究, 等等。因此, 有必要同时对生殖器官和营养器官在雄性不育发生进程中内源激素的动态变化进行全面研究。

在水稻上, 张能刚等^[3]研究了光敏核不育水稻农垦 58s 雄性不育发生进程中叶片和幼穗 IAA 以及叶片 GA_{1+4} 和 ABA 含量的动态变化, 并认为生长素亏缺是该试材雄性不育发生的原因, 叶片中 GA_{1+4} 和 ABA 通过改变其中 IAA 含量来影响育性。黄厚哲等^[4]发现细胞质雄性不育水稻花药中结合态生长素含量显著低于其保持系, 并认为生长素亏缺是该试材雄性不育发生的原因。黄少白等^[5]分析了 CMS 水稻幼穗和叶片 IAA 和 GA_{1+4} 含量的动态变化, 他们认为 CMS 的发生与 IAA 和 GA 亏缺有关。Nakajima 等^[6]发现水稻不育花药中 GA_{1+4} 含量低于可育花药。但是, 其他激素的变化如何呢? 各类激素间的平衡与 CMS 发生有无关系呢? 均未见报道。为此, 我们以 CMS 水稻珍汕 97A 及其保持系珍汕 97B 为试材, 利用酶联免疫测定技术追踪分析了幼穗发育进程中叶片、幼穗和花药中 IAA、 GA_{1+4} 、iPAs 和 ABA 含量的动态变化, 以期对上述诸问题有所认识。

1 材料与方法

试验材料 为野败型细胞质雄性不育系珍汕 97A 及其保持系珍汕 97B。种子经催芽后分 3 批播种, 常规管理。于幼穗发育的雌雄蕊形成期、花粉母细胞形成期和花粉母细胞减数分裂期以及单核、二核和三核花粉期^[7]分别取最上一片全展叶、幼穗和花药, 准确称重后保存于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

内源激素的测定 将上述材料用 80% 预冷的甲醇在弱光下(冰浴中)研磨成匀浆以提取激素, 后按吴颂如等^[8]的方法分离纯化和用酶联免疫测定法测试 IAA, GAs ($GA_{1+3+4+7}$), 因水稻

中只存在 GA_1 和 GA_4 ^[9], 所以本文用 GA_{1+4} 表示 GAs 的含量, ABA 和 iPAs [iP+(9R)iP+(9R-5')iP]。酶联免疫试剂盒购自南京农业大学。试验重复3次, 取平均值, 并按时间进程绘制成相应图表, 供分析讨论用。

2 结果与分析

2.1 IAA 含量的动态变化

由图 1a 可知, 从幼穗发育的雌雄蕊形成期至三核花粉期, 保持系叶片中 IAA 含量高于不育系, 二核花粉期时前者是后者的 20 多倍。在幼穗和花药中也以保持系为高, 不育系为低, 尤其是花药中两者差别极大(图 1b, c)。说明 IAA 亏缺既发生在营养体上又发生在生殖体上。

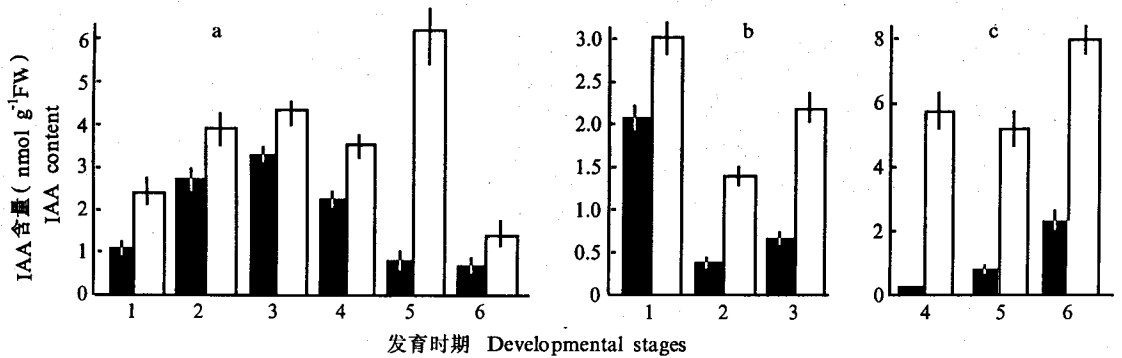


图 1 幼穗发育期间水稻细胞质雄性不育系(■)及其保持系(□)叶片(a)、幼穗(b)和花药(c)中 IAA 含量的动态变化

Fig. 1 Changes of IAA content in leaves (a), panicles (b) and anthers (c) of CMS rice (■) and its maintainer line (□) during panicle development

幼穗和花粉发育时期^[7]: 1. 雌雄蕊形成期; 2. 花粉母细胞形成期; 3. 花粉母细胞减数分裂期; 4. 单核花粉期; 5. 二核花粉期; 6. 三核花粉期

Developmental stages of panicles and pollens^[7]: 1. Stamen and pistil formation stage; 2. Pollen mother cell (PMC) formation stage; 3. PMC meiosis stage; 4-6. Pollen developmental stages; 4. Uninucleate; 5. Binucleate; 6. Trinucleate

2.2 GA_{1+4} 含量的动态变化

从雌雄蕊形成期到单核花粉期, 两系叶片中 GA_{1+4} 含量的变化趋势相似, 都为先升后降, 在花粉母细胞形成期达到峰值, 不过在单核花粉期后, 保持系的含量上升而不育系的变化不大, 且前者高于后者(图 2a)。在幼穗中, 从花粉母细胞形成期到花粉母细胞减数分裂期, 保持系比不育系高出 1 倍左右(图 2b); 在花药中, 除单核期外, 保持系的高出更多, 且保持系的上升而不育系的下降(图 2c)。暗示幼穗与花药中 GA_{1+4} 含量不足可能与 CMS 有关。

2.3 ABA 含量的动态变化

在叶片中, 不育系 ABA 含量的变化趋势与保持系的不同, 在幼穗发育早期不育系的明显高于保持系; 在中期, 与保持系相近; 而在后期又略高于保持系(图 3a)。在幼穗中, 不育系的也显著高于保持系(图 3b)。在花药中的情况亦是如此, 尤以三核花粉期为甚(图 3c)。这说明

ABA 在不育系中出现了盈积，而且这种盈积无论是在营养体中还是在生殖体中都存在。

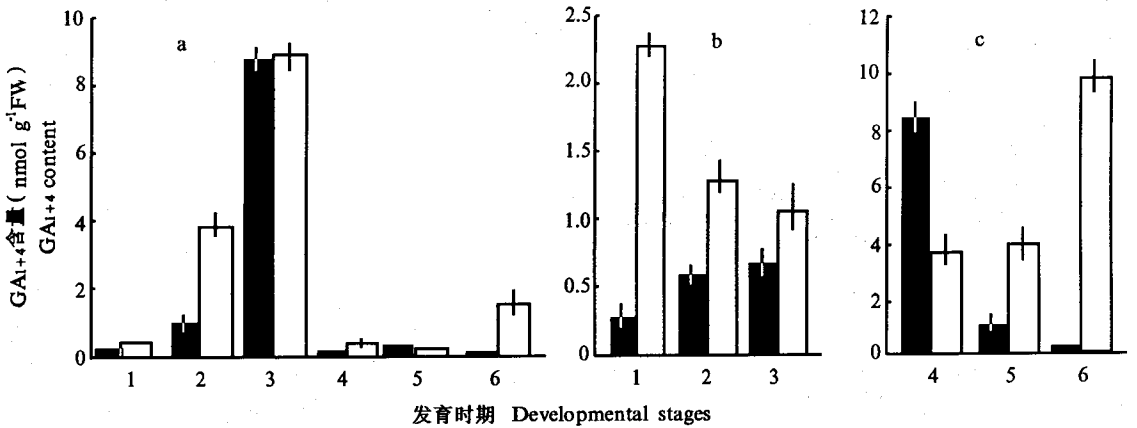


图 2 幼穗发育期间水稻细胞质雄性不育系 (■) 及其保持系 (□) 叶片 (a)、幼穗 (b) 和花药 (c) 中 GA₁₊₄ 含量的动态变化
Fig. 2 Changes of GA₁₊₄ content in leaves (a), panicles (b) and anthers (c) of CMS rice (■) and its maintainer line (□) during panicle development

幼穗和花粉发育时期同图 1 Developmental stages 1-6 are the same as in Fig. 1

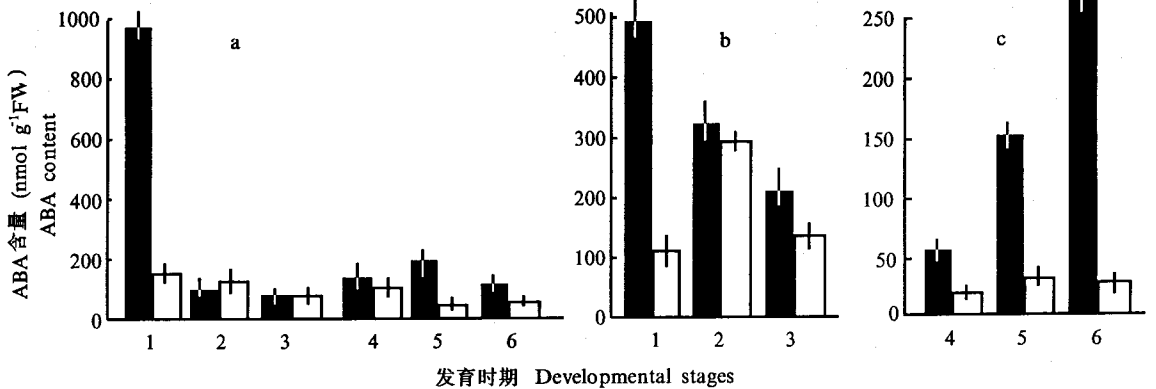


图 3 幼穗发育期间水稻细胞质雄性不育系 (■) 及其保持系 (□) 叶片 (a)、幼穗 (b) 和花药 (c) 中 ABA 含量的动态变化
Fig. 3 Changes of ABA content in leaves (a), panicles (b) and anthers (c) of CMS rice (■) and its maintainer line (□) during panicle development

幼穗和花粉发育时期同图 1 Developmental stages 1-6 are the same as in Fig. 1

2.4 iPAs 含量的动态变化

保持系叶片中 iPAs 显著高于不育系，并且在花粉母细胞形成期到花粉母细胞减数分裂期出现极明显的峰值，而此期不育系处于低谷 (图 4a)。幼穗中两系的差别也十分显著，保持系明显高于不育系 (图 4b)；花药中亦如此，只不过两系的含量都较低 (图 4c)。这说明 iPAs 在不育系生殖体和营养体中都发生了亏缺。

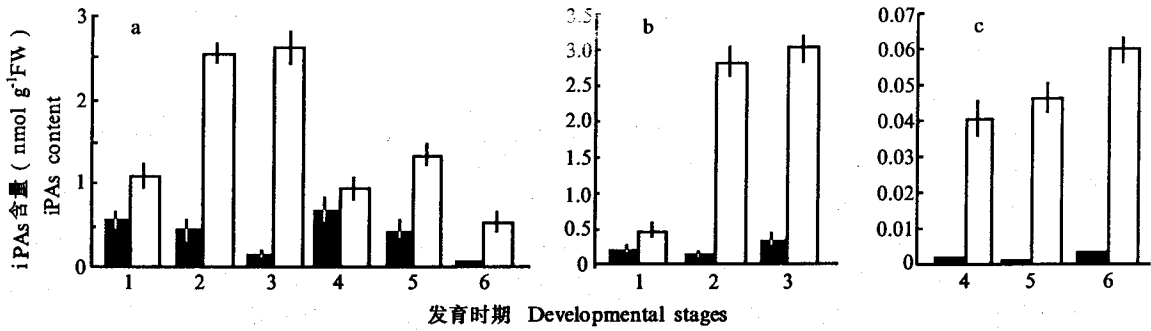


图 4 幼穗发育期间水稻细胞质雄性不育系 (■) 及其保持系 (□) 叶片 (a)、幼穗 (b) 和花药 (c) 中 iPAs 含量的动态变化

Fig. 4 Changes of iPAs content in leaves (a), panicles (b) and anthers (c) of CMS rice (■) and its maintainer line (□) during panicle development

幼穗和花粉发育时期同图 1 Development stages 1-6 are the same as in Fig. 1

2.5 (IAA + GA₁₊₄ + iPAs)/ABA 的动态变化

从以上结果可以看出, IAA、GA₁₊₄ 和 iPAs 在雄性不育发生中出现亏缺, 而 ABA 则积累。因此, 对 CMS 发生进程中两类激素间平衡, 即 (IAA + GA₁₊₄ + iPAs)/ABA 的动态变化进行分析很有必要。从图 5 可见, 在幼穗发育中, 保持系叶片的 IAA + GA₁₊₄ + iPAs 与 ABA 之比值始终高于不育系, 尤其是在二核期 (图 5a)。在幼穗中保持系的比值快速上升, 而不育系的则变化不大, 且前者显著高于后者 (图 5b)。在花药中, 保持系的也始终高于不育系的, 且不育系的呈下降趋势, 而保持系则先降后升 (图 5c)。说明促进类激素的匮乏以及抑制类激素的盈积可能与水稻细胞质雄性不育发生有关。

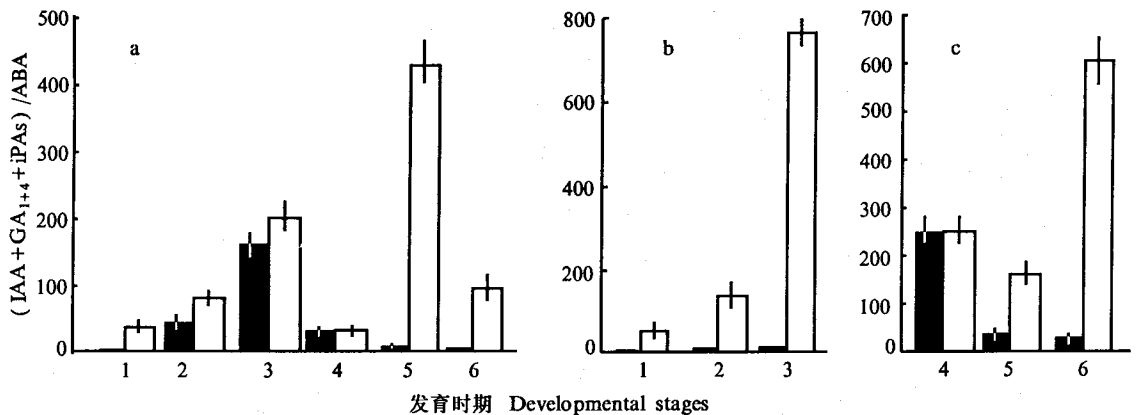


图 5 幼穗发育期间水稻细胞质雄性不育系 (■) 及其保持系 (□) 叶片 (a)、幼穗 (b) 和花药 (c) 中 (IAA + GA₁₊₄ + iPAs)/ABA 的动态变化

Fig. 5 Changes of (IAA + GA₁₊₄ + iPAs)/ABA content in leaves (a), panicles (b) and anthers (c) of CMS rice (■) and its maintainer line (□) during panicle development

幼穗和花粉发育时期同图 1 Development stages 1-6 are the same as in Fig. 1

3 讨论

有关植物激素与植物雄性不育发生的关系的研究已有报道。前人的研究显示在雄性不育发生进程中5大类激素都有涉及。Sawhney等^[1]在总结植物激素与雄性不育的关系时指出:生长素含量的增加,乙烯的过度产生,ABA水平的提高以及GAs和CTKs含量的降低会诱发大多数植物产生雄性不育。当然,他们也指出了例外的情况。此假说在许多试材上是完全适合或部分适合的,例如番茄^[10-12]和油菜^[13-16]。不过,在CMS玉米上却发现IAA亏损^[17]、GAs^[18]和CTKs^[16]盈余与雄性不育有关,在CMS水稻上的情况又如何呢?黄厚哲等^[4]和黄少白等^[5]先后发现在CMS水稻花药中结合态IAA和幼穗或叶片中游离态IAA明显低于其相应保持系。黄少白等^[5]以及Nakajima等^[6]还发现不育系幼穗或叶片以及花药中GA₁₊₄含量也低于保持系。我们的研究结果(图1,2)进一步证实了这一点。说明IAA和GA₁₊₄的亏缺可能与水稻CMS发生有关。

本研究还显示,CMS水稻叶片、幼穗和花药中iPAs这类细胞分裂素含量变化趋势明显不同于其保持系,以不育系为低,保持系为高(图4),说明此类激素亏缺也可能与雄性不育有关。而且CMS水稻叶片、幼穗及花药中ABA含量变化趋势与其保持系也不相同(图3),并且,以不育系的为高。说明水稻CMS的发生涉及到ABA含量的动态变化的改变。有关水稻细胞质雄性不育与iPAs和ABA含量变化关系的报道尚属首次。

既然上述4种激素中IAA、GA₁₊₄和iPAs在不育系中亏缺,而ABA积累,那么,这两大类植物激素之平衡变化与CMS有无关系呢?目前尚未见有关报道。本研究表明,随着幼穗发育的进行,IAA+GA₁₊₄+iPAs与ABA之比值的变化的不育系和保持系叶片(图5a)、幼穗(图5b)和花药(图5c)中明显不同,保持系的远高出不育系的。说明不同类型激素在CMS发生过程中可能存在相互作用。这种比值变化能更清楚地反映不育系与其保持系在激素方面的差异。早就有人指出^[1],是激素间的比例不仅仅是单种激素对植物CMS发生起调控作用,本研究进一步表明了这一点。至于激素对CMS发生的调控机制尚不清楚。有人认为生长素亏缺会引起花药或花丝分化不良,导致花药物质供应不畅,最终诱发雄性不育^[4,5]。我们认为除了上述的可能机理外还可能与促进类激素的全面亏损导致幼穗或花药库强度降低,造成它们对物质和能量的竞争力下降,致使它们得不到发育所需的物质和能量,最终诱发雄性不育。至于激素诱发水稻CMS发生的确切机制则有待深入研究。

参考文献

- 1 Sawhney V K, Shukla A. Male sterile in flowering plants: are growth substances involved? *Amer J Bot*, 1994, 81(12):1640-1647
- 2 田长恩, 张明永, 梁承鄞等. 植物雄性不育生理生化研究新进展. 生命科学, 1998 (印刷中)
- 3 张能刚, 周燮. 三种酸性内源激素与农垦58s育性转换的关系. *南京农业大学学报*, 1992, 15(3):7-12
- 4 黄厚哲, 楼士林, 王厚聪等. 植物生长素亏缺与雄性不育的发生. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1984, (1):82-97
- 5 黄少白, 周燮. 水稻细胞质雄性不育与内源GA₁₊₄和IAA的关系. *华北农学报*, 1994, 9(3):16-20
- 6 Nakajima M, Yamaguchi S, Kizawa N et al. Semi-quantification of GA₁ and GA₄ male sterile anthers of rice by

- radioimmunoassay. *Plant & Cell Physiol*, 1991, 32:511-512
- 7 丁颖编. 中国水稻栽培学. 北京: 农业出版社, 1961
- 8 吴颂如, 陈婉芬, 周燮. 酶联免疫法(ELISA)测定内源植物激素. *植物生理学通讯*, 1988, (5):53-57
- 9 Kobayashi M. Fluctuation and localization of endogenous gibberellins in rice. *Agric Biol Chem*, 1988, 52: 1187-1194
- 10 Singh S, Sawhney V K. Cytokinins and abscisic acid in roots of the stamenless-2 mutant of tomato. *Reports of the Tomato Genetics Cooperative*, 1992, 42:34-35
- 11 Sawhney V K. Morphogenesis of stamenless-2 mutant in tomato. III. Relative levels of gibberellins in the normal and mutant plants. *J Exp Bot*, 1974, 25:1004-1647
- 12 Singh S, Sawhney V K, Pearce D W. Temperature effects on endogenous indole-3-acetic acid levels in leaves and stamens of the normal and male sterile "stamenless-2" mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell & Enviro*, 1992, 15:373-377
- 13 Shukla A, Sawhney V K. Cytokinins in genic male sterile line of *Brassica napus*. *Physiol Plant*, 1992, 85:24-29
- 14 Singh S, Sawhney V K. Endogenous hormones in seeds, germination behaviour and early seedling characteristics in a normal and ogura cytoplasmic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus* L.). *J Exper Bot*, 1992, 43(256): 1497-1505
- 15 Singh S, Sawhney V K. Cytokinins in a normal line and the ogura (*ogu*) cytoplasmic male-sterile line of rapeseed (*Brassica napus*). *Plant Sci*, 1992, 86:147-154
- 16 Shukla A, Sawhney V K. Abscisic acid: one of the factors affecting male sterility on *Brassica napus*. *Physiol Plant*, 1994, 91:522-528
- 17 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, 20(1):26-32
- 18 Pharis R P. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 1985, 36:517-568