

棉花恢复系的恢复力与花药谷胱甘肽 S 转移酶活性的关系

朱云国 王学德* 赵佩欧 倪西源*

(浙江大学农学系, 浙江杭州 310029)

摘要 转 *gst* 基因棉花恢复系“浙大强恢”克服了传统恢复系的恢复力不够强的缺陷, 用此种恢复系配制的杂种 F_1 , 其花粉育性强, 杂种优势明显。进一步研究的结果表明: 在造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟 3 个时期, 转基因恢复系花药中谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 活性比受体恢复系花药中的都有极显著提高。与受体恢复系配制的 F_1 相比, 转基因恢复系配制的 F_1 花药中 GST 酶活性也有极显著提高。相关性分析表明, 以“浙大强恢”和“DES-HAF277”为父本配制的 F_1 , 其可育花粉率与其小孢子减数分裂时期和花粉成熟时期花药中 GST 酶活性呈极显著正相关, 显示 GST 酶对棉花花粉育性有明显的促进作用。

关键词 陆地棉; 细胞质雄性不育; 转基因恢复系; 花粉育性; 谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)

中图分类号: S562 文献标识码: A

Relationship between Glutathione S-Transferase Activity of Restorer Anthers and Pollen Fertility of F_1 Hybrid in Upland Cotton

ZHU Yun-Guo WANG Xue-De ZHAO Pei-Ou NI Xi-Yuan

(Department of Agronomy, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract “Zheda Strong Restorer”, a transgenic restorer developed by transferring Glutathione S-Transferase (GST) gene into a restorer DES-HAF277, had overcome the defect of weak restorability in restorers to cytoplasmic male sterility. When this transgenic restorer was used as a male parent and crossed with female sterile lines, its hybrids (F_1) had stronger pollen fertility and recorded high heterosis. Further study indicated that the GST activity in the anther of the transgenic restorer and its hybrids were higher obviously than that in the recipient restorer at the stage of sporogenous cell division, microspore meiosis and pollen maturation. There was a highly significant relationship between the percentage of viable pollens and the GST activity in the anther of F_1 hybrid at microspore meiosis phase and pollen maturation phase, which confirmed that GST over expression in anther could enhance pollen fertility of F_1 hybrid in upland cotton.

Key words Upland cotton; Cytoplasmic male sterility; Transgenic restorer; Pollen fertility; Glutathione S-transferase (GST)

棉花细胞质雄性不育植株自身不能产生花粉粒, 但雌配子正常可育。利用棉花细胞质雄性不育的“三系”配套系统, 通过蜜蜂等媒介传粉进行棉花杂种种子的生产, 可省去人工“去雄”和“授粉”, 在棉花杂种优势利用中具有重要价值。20 世纪 70 年代美国育成具有哈克尼西棉细胞质的雄性不育系“DES-HAMS277”, 但由于其恢复系“DES-HAF277”的恢复力不够强, 一直未能在生产上应用^[1, 2]。王学

德用根癌农杆菌介导法, 将一个具有抗逆性能的谷胱甘肽 S 转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 基因 (*gst*) 导入恢复系“DES-HAF277”, 从转化棉株后代中筛选到一个对不育系具有强恢复力的恢复系, 命名为“浙大强恢”。“浙大强恢”对不育系的恢复力比受体恢复系“DES-HAF277”提高 25.8%, 从而使杂种 F_1 单株结铃数多 3.6 个, 不孕籽率降低 10.1%, 皮棉产

*基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划, 2001AA212081), 国家转基因植物研究与产业化开发专项 (J00-B-002-10) 和国家教育部科研基金 (重大 0114) 资助项目。

作者简介: 朱云国 (1977 -) 男, 浙江长兴人, 博士生, 主要从事棉花遗传育种方面的研究。* 通讯作者: 王学德, E-mail: xdwang@zju.edu.cn
Received (收稿日期): 2002-06-06, Accepted (接受日期): 2003-02-16.

量提高 10.6%^[3]。以基因 *gst* 作为探针进行的 Southern 和 Northern 核酸杂交分析表明,“浙大强恢”中含有外源基因 *gst*,并有高的表达水平^[3]。转基因恢复系“浙大强恢”的育成,在理论研究和生产实践中都具有重要意义。为进一步研究“浙大强恢”外源 *gst* 基因对不育系育性恢复力提高的作用机制,本文以受体恢复系及其 F₁ 为对照,对转基因强恢复系及其 F₁ 花药中的 GST 酶活性进行了测定,并对其可能的作用机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

具有哈克尼西棉 (*G. harknessii* Brandegees) 细胞质的雄性不育系 3 个:DES-HAMS277、中 12A 和抗 A;恢复系 2 个:转基因恢复系“浙大强恢”和受体恢复系“DES-HAF277”;以及用上述不育系和恢复系配制的杂交组合 6 个。以转基因恢复系“浙大强恢”及其所配的 F₁ 的造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟 3 个时期的花药为材料,以受体恢复系“DES-HAF277”及其所配的 F₁ 相同时期的花药为对照,测定花药中 GST 酶活性。酶活性测定在紫外分光光度计 BECKMAN DU640 上进行,所需的 1-氯-2,4-二硝基苯 (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) 和还原型谷胱甘肽 (Glutathione-SH, GSH) 等试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 GST 酶液的制备

早上 6:00 ~ 7:00,摘取转基因恢复系“浙大强恢”、受体恢复系“DES-HAF277”以及所配的 6 个杂交组合 (F₁) 的不同发育时期的花蕾,镜检区分出造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟 3 个时期的花蕾。称取 1 g 花药,在液氮中磨碎后,加 10 mL 预冷的提取液 [0.1 mol/L Tris-HCl pH 7.8、0.5 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L 巯基乙醇和 1% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)]。匀浆,于 4 °C 下以 2000 ×g 离心 10 min,取上清液,再以 12000 ×g 离心 10 min,所得的上清液供 GST 酶活性测定。

1.2.2 GST 酶活性的测定

以 CDNB 为底物,按 Habig 等^[4]的方法测定 GST 酶活性。反应体系包括:30 μL 酶提取液,0.9 mL 3.3 mmol/L GSH,1.97 mL 100 mmol/L 的磷酸钾盐缓冲液 (pH 6.5) 和 100 μL 30 mmol/L CDNB (溶解在无

水乙醇中)。加入 CDNB 于波长 340 nm 处读取反应开始后 90 s 至 120 s 间的光密度增加量。以未加酶液的为对照。酶活性以每分钟形成 1 μmol 产物为一个酶单位表示。

2 结果与分析

2.1 转基因恢复系与受体恢复系对不育系恢复力的比较

以受体恢复系“DES-HAF277”为对照,“浙大强恢”分别与 DES-HAMS277、中 12A 和抗 A 等 3 个不育系杂交,用甲萘酚-联苯胺染色法^[5]统计 6 个组合的 F₁ 可育花粉率的结果 (表 1) 显示,以“浙大强恢”为父本与不育系杂交的 F₁ 的可育花粉率平均达 91.32%,比 DES-HAF277 为父本的 F₁ 的平均可育花粉率高 25.85%,差异达极显著水平。这与王学德等报道的结果^[1]基本一致。“浙大强恢”的恢复力比受体恢复系有极显著的提高,表明 *gst* 基因对不育系的育性有促进作用。

表 1 转基因恢复系和受体恢复系在恢复力上的比较
Table 1 Comparison of restorability of transgenic restorer with recipient restorer

杂交组合 Combinations	总观察数 Total	可育花粉粒数 Viable pollens	可育花粉率 Viable pollens (%)
DES-HAMS277 × 浙大强恢	2877	2598	90.30
DES-HAMS277 × Zheda Strong Restorer			
中 12A × 浙大强恢	2659	2431	91.43
Zhong 12 A × Zheda strong restorer			
抗 A × 浙大强恢	2977	2745	92.21
Kang A × Zheda Strong Restorer			
DES-HAMS277 × DES-HAF277	2599	1675	64.45
中 12A × DES-HAF277	2914	1913	65.65
Zhong 12 A × DES-HAF277			
抗 A × DES-HAF277	2789	1847	66.22
Kang A × DES-HAF277			
浙大强恢所配制的组合 (F)			
平均 Combinations with Zheda Strong Restorer	2837.67	2591.33	91.32
Mean DES-HAF277 所配制的组合 (CK) Combinations with DES-HAF277	2767.33	1811.67	65.47
F ₁ - CK	-	-	25.85 *

2.2 转基因恢复系与受体恢复系花药中 GST 酶活性的比较

从表 2 可以看出,在花药发育过程中,转基因强恢复系“浙大强恢”和受体恢复系“DES-HAF277”花

药中 GST 酶活性,呈先上升后下降的变化趋势。在小孢子减数分裂时期和花粉成熟时期“浙大强恢”花药中 GST 酶活性,分别为 0.2929 和 0.1899 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$,是造孢细胞增殖时期(0.141 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$)的 2.08 和 1.35 倍。而“DES-HAF277”花药 GST 酶的活性,则分别为 0.1731 和 0.0991 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$,是造孢细胞增殖时期(0.1089 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$)的 1.59 和 0.91 倍。从表 2 还可以看到,转基因恢复系“浙大强恢”花药中 GST 酶活性,在造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟时期比受体恢复系的分别提高 29.48%、69.21%和 91.62%,都达到了极显著水平。这表明在花药发育过程中“浙大强恢”和“DES-HAF277”的花药中 *gst* 基因的表达量是先上升后下降。与受体恢复系“DES-HAF277”相比,在造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟 3 个时期“浙大强恢”花药中 *gst* 基因的表达量,都有极显著提高,且提高的幅度呈递增趋势。

表 2 转基因恢复系与受体恢复系花药间 GST 酶活性的比较

恢复系 Restorer	不同发育时期花药中的 GST 酶活性 GST activities of anthers at different developmental stages ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$)		
	造孢细胞增殖时期 Sporogenous cell division stage	小孢子减数分裂时期 Microspore meiosis stage	花粉成熟时期 Pollen maturation stage
	浙大强恢 Zheda Strong Restorer	0.141	0.2929
DES-HAF277(CK)	0.1089	0.1731	0.0991
比 CK 增加(%) Increase based on CK	29.48 **	69.21 **	91.62 **

2.3 转基因恢复系与受体恢复系所配制的 F_1 花药间 GST 酶活性的比较

以转基因恢复系“浙大强恢”和受体恢复系“DES-HAF277”为父本分别与 3 个不育系 DES-HAMS277、中 12A 和抗 A 杂交,测定不同发育时期 6 个 F_1 组合花药中 GST 酶活性的结果表明,与它们的父本一样,在花药的发育过程中 F_1 花药的 GST 酶活性呈先上升后下降的趋势。其中,以“浙大强恢”为父本的 F_1 花药的 GST 酶活性在小孢子减数分裂和花粉成熟时期平均为 0.2832 和 0.1869 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$,分别是造孢细胞增殖时期(平均为 0.138 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$)的 2.05 和 1.35 倍。而以“DES-HAF277”

为父本的 F_1 花药的 GST 酶活性在小孢子减数分裂和花粉成熟时期平均为 0.1626 和 0.0936 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$,分别是造孢细胞增殖时期(平均为 0.1061 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$)的 1.53 和 0.88 倍。从表 3 中还可以看到,在造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟时期,以“浙大强恢”为父本的 F_1 花药的 GST 酶活性比以受体恢复系“DES-HAF277”为父本的 F_1 花药的 GST 酶活性分别增加了 30.37%、74.17%和 99.68%,都达到了极显著水平。这表明,同父本一样,在造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟 3 个时期“浙大强恢”的 F_1 花药中 *gst* 基因的表达量比“DES-HAF277”的 F_1 都有极显著提高,且提高的幅度呈递增趋势。从表 2 和表 3 还可看到,在造孢

表 3 转基因恢复系与受体恢复系所配制的 F_1 花药间 GST 酶活性的比较

杂交组合 Combination	不同发育时期花药中的 GST 酶活性($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g} \text{FW}$) GST activities of anthers at different developmental stages		
	造孢细胞增殖时期 Sporogenous cell division stage	小孢子减数分裂时期 Microspore meiosis stage	花粉成熟时期 Pollen maturation stage
DES-HAMS277 \times 浙大强恢 DES-HAMS277 \times Zheda Strong Restorer	0.1377	0.283	0.1867
中 12A \times 浙大强恢 Zhong12 A \times Zheda Strong Restorer	0.1378	0.2832	0.1868
抗 A \times 浙大强恢 Kang A \times Zheda Strong Restorer	0.1385	0.2834	0.1871
DES-HAMS277 \times DES-HAF277 中 12A \times DES-HAF277	0.1059	0.1625	0.0934
Zhong12 A \times DES-HAF277	0.106	0.1626	0.0935
抗 A \times DES-HAF277 Kang A \times DES-HAF277	0.1064	0.1627	0.0938
浙大强恢所配制的组合(F_1) Combinations(F_1) with Zheda Strong Restorer	0.138	0.2832	0.1869
平均 DES-HAF277 所配制的组合(CK) Mean Combinations(CK) with DES-HAF277	0.1061	0.1626	0.0936
F_1 比 CK 增加(%) F_1 increases over CK	30.07 **	74.17 **	99.68 **

细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟 3 个时期父本花药中 *gst* 基因的表达量虽然比它们同时期 F_1 花药中 *gst* 基因的表达量高一些 (平均高出 3.56%) ,但都没达到显著水平。相关分析表明,以“浙大强恢”和“DES-HAF277”为父本配制的 F_1 ,其可育花粉率与其造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟 3 个时期花药中的 GST 酶活性的相关系数分别为 0.871、0.994 和 0.926 与 0.860、0.980 和 0.918 ,达显著或极显著水平。这表明,以“浙大强恢”和“DES-HAF277”为父本配制的 F_1 ,其可育花粉率与其小孢子减数分裂时期和花粉成熟时期花药中的 GST 酶活性极显著正相关,与其造孢细胞增殖时期花药 GST 酶的活性显著正相关。

3 讨论

正常情况下,生物体内活性氧的产生和清除呈平衡状态,活性氧维持一个很低的浓度水平。已有报道指出,植物细胞质雄性不育与线粒体基因的突变有关^[6,7],线粒体基因突变常会引起线粒体呼吸电子传递链的结构与功能异常,以致活性氧大增。过量的活性氧对生物体有一系列的毒害作用,如进攻多聚不饱和脂肪酸可引起脂质过氧化,导致生物膜结构和功能的改变;损伤蛋白质的巯基(-SH)和氨基可使蛋白质变性、交联,使酶的活性丧失;损伤 DNA 可导致细胞突变。活性氧还会损伤线粒体的结构和功能,引起线粒体结构迅速膨胀,氧化磷酸化效率降低和细胞色素氧化酶(COD)活力下降。在植物不同细胞中,雄性细胞(花粉)对线粒体结构和功能失调的反应最为敏感,故线粒体结构和功能的失调常会导致花粉育性下降,乃至不育。

谷胱甘肽 S 转移酶(GST)具有多种生理功能,它在植物解毒和防御活性氧伤害中有重要作用,其主要功能之一是能提高植物细胞膜的修复能力,在基因工程中常用于提高植物的抗逆能力^[8]。棉花细胞质雄性不育系的线粒体基因也会发生突变^[9,10]。以前的细胞形态学观察表明,棉花细胞质雄性不育系的败育是在造孢细胞增殖至减数分裂时期^[10]。本文结果再次表明,在造孢细胞增殖、小孢子减数分裂和花粉成熟 3 个时期,“浙大强恢”花药的 GST 酶活性比“DES-HAF277”有提高,以“浙大强恢”为父本的 F_1 花药中 GST 酶活性也比以“DES-HAF277”为父本的 F_1 有所增加。这表明 *gst* 基因在转基因强恢

复系及其 F_1 的花药中呈高效表达。因此可以推测,转 *gst* 基因恢复系“浙大强恢”对不育系育性恢复力的提高,是通过提高杂种 F_1 花药中 *gst* 基因表达来增加杂种 F_1 花药中 GST 酶活性的,因而杂种 F_1 花药细胞(特别是生殖细胞)中清除活性氧和膜修复能力提高,活性氧对生殖细胞的损伤减弱,杂种 F_1 花粉粒的育性提高,杂种 F_1 的结铃性提高,不孕籽率降低,最终促进杂种优势的高效表达。

转基因强恢复系的育成对棉花杂种优势的大面积利用,以及促进棉花种子产业化进程具有重要意义。转基因恢复系“浙大强恢”对不育系育性恢复力提高机理的研究,不仅可以为“浙大强恢”的田间表现提供理论依据,而且还有助于加深对细胞质雄性不育机理和恢复机制的认识,进而为更好地利用细胞质雄性不育提供新的思路。

References

- [1] Wang X-D(王学德), Li Y-Y(李悦有). Development of transgenic restorer of cytoplasmic male sterility in upland cotton. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2002, 35(2): 137—141
- [2] Wang X-D(王学德), Zhang T-Z(张天真), Pan J-J(潘家驹). Cytoplasmic effects of cytoplasmic male sterile upland cotton. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1997, 23(4): 393—399
- [3] Yu Z-H(俞志华), Wang X-D(王学德). Study on and improvement of male sterility in cotton. *Acta Gossypii Sinica* (棉花学报), 1999, 11(5): 268—274
- [4] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(22): 7130—7139
- [5] Research Group of Cotton and Wheat of Huanggang Campus of Huzhong Agricultural Academy(华中农学院黄冈分院棉麦组). Mensuration viability of cotton pollen by different pigmentation methods. *Heredity and Breeding* (遗传与育种), 1977, (5): 35—36
- [6] Hanson M R. Plant mitochondrial mutation and male sterility. *Annual Reviews of Genetics*, 1991, 15: 988—991
- [7] Wang X-D(王学德), Zhu Y-G(朱英国). mRNA differential display between sterile and fertile anther of rice and analysis of cDNA differential fragments. *Science in China* (Series C), 1998, 41(2): 217—224
- [8] Roxas V P. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 988—991
- [9] Wang X-D(王学德). Analyses of mitochondrial protein and DNA from cytoplasmic male sterile cotton. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2000, 26(1): 35—39
- [10] Wang X-D(王学德), Zhang T-Z(张天真), Pan J-J(潘家驹). Cytological observation of microsporogenesis and RAPD analysis of mitochondrial DNAs for cytoplasmic male sterile cotton lines. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1998, 31(2): 70—75