

棉花“洞A”型核雄性不育形态及机理研究现状

唐雯, 张相璋* (1. 四川农业大学, 四川雅安625014; 2. 四川省农业科学院经济作物研究所, 四川简阳641400)

摘要 综述了现阶段棉花“洞A”型核雄性不育系花粉败育的研究概况, 从形态学、细胞形态学、生理生化及分子生物学等方面总结了研究棉花“洞A”型核雄性不育败育机理的进展, 并且对该领域研究和应用中存在的问题、发展前景提出了一些看法。

关键词 “洞A”; 花粉败育; 形态学; 细胞学; 生理生化; 分子生物学

中图分类号 S562 .032 文献标识码 A 文章编号 0517- 6611(2008) 04- 01402- 03

Status of Research on the Shape and Mechanism of Nuclear Male Sterile Line “Dong A” of Cotton

TANG Wen et al (Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract The currently general situation of research on the pollen sterility of nuclear male sterile line “Dong A” of cotton was summed up. The progress of research on the sterility mechanism of nuclear male sterile line “Dong A” of cotton was summarized from aspects such as morphology, cytology, physiology, biochemistry and molecular biology. And some thoughts about the problems in the research and application in this field and its development prospect were put forward.

Key words “Dong A”; Pollen sterility; Morphology; Cytology; Physiology and biochemistry; Molecular biology

植物育性的表达是一个极其复杂的过程。它涉及花粉发育相关基因在一定时空顺序上的严格表达以及体内外因子对这种表达调控的影响等因素。在涉及花粉发育的上万种基因中, 只要有一种关键基因发生了突变或其表达调控出现异常, 就有可能导致花粉的败育。细胞核雄性不育性是高等植物中广泛存在的一种现象, 是细胞核不育基因作用的结果, 在杂种优势利用和群体改良中有重要的应用价值。细胞核雄性不育系因花药绒毡层过早退化以及花粉母细胞不能通过减数分裂而死亡。它是一种典型的无花粉型不育系。

棉花“洞A”不育系是四川省仪陇县棉花原种场职工于1972年从陆地棉品种“洞庭一号”中发现的一个天然不育突变株, 经多代连续回交选育而得到。“洞A”是一个农艺性状好、不育性稳定、恢复系广泛、能够遗传的类型。1982年四川省农业科学院棉花研究所(现经济作物研究所)黄观武等鉴定发现, 棉花“洞A”雄性不育性状主要受一对隐性核基因控制, 并将其命名为 ms_1 。1992年张天真等将不育基因与国外鉴定定名的 ms_1 、 ms_2 、 ms_3 等进行等位性鉴定, 发现均为非等位的, 因此认为这是一个新的棉花核雄性不育基因, 并建议把这个新的不育基因按国际统一基因符号定名为 ms_{14} ^[1]。“洞A”后来又转育为“473A”、“751A”、“抗A1”、“抗A2”、“21A”、“177A”、“GA”、“抗A3”等。目前, “洞A”及其衍生不育系应用一系两用法配制杂种, 经大面积种植, 一般增产10%以上, 是棉花杂优利用的一条有效途径, 在我国棉花生产中发挥了重要作用。

1 形态学研究

植物的雄性不育可在植物的外部形态特征中反应出来, 尤其是在花器官中表现得比较明显, 因此研究棉花的雄性不育株与可育株的外部形态的差异对不育株与可育株的识别、繁殖和制种具有重要意义。“洞A”型核雄性不育基因对棉花的形态特征有何影响, 特别是与生殖有关的重要器官——花器官有何影响, 这种花器官上的变化对于繁殖和制种有无影响等, 都值得进行研究。

汤泽生等就“洞A”兄妹系第6代、第8代的不育株和可育株的苞叶、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊和花药至柱头的距离等进行了比较, 发现二者有明显的差异^[2]。主要表现在: “洞A”不育花与可育花的萼片、花瓣差异不明显; 花药小, 数量少, 不饱满, 不开裂; 花丝短; 花药内花粉少, 大小不均匀, 相差悬殊, 达10倍之多; 花粉粒形状不一, 花粉内容物不充实, 棘突不明显或无棘突; 雌蕊长, 子房大, 柱头外露明显; 胚珠稍多。研究表明, “洞A”不育花的子房、胚珠比可育花发育好, 并达到0.05显著水平。这些差异是由不育株和可育株的遗传基础不同造成物质和生理活性的差异, 从而使一些物质在花器官各部分的分配、积累和消耗不同, 形成2种花器官的一些必然差异。正是这些差异给棉花雄性不育系的利用和杂种种子的发育提供了一个良好的物质基础。

根据四川农业科学院经济作物研究所多年的观察, 在“洞A”的衍生不育系(抗A系列、GA系列等)中, 不育花外观的退化程度与不育株的长势有一定关系。同一不育系种植在不同地块的表现有一定的差异。凡水肥充足、植株长势旺的田块, 不育花花药退化程度较小, 肉眼观察较饱满, 不育株中有30%~40%植株花朵的基部花药有少量花粉, 杂交制种时只要在正常时间用足够的恢复系授粉后不会产生自交结实; 相反, 凡在水肥缺乏、长势较差的田块, 不育花花药退化程度好, 肉眼观察约有60%~70%的不育株花药完全干瘪, 呈黄褐色。不同的衍生不育系间也有差异。一般, 生长势偏弱, 营养器官发育偏小, 植株紧凑的不育系退化程度较高, 如洞A、473A和转基因不育系抗A3等; 反之, 生长势旺, 营养器官发育偏大, 植株高大松散的不育系退化程度稍低, 如抗A1、抗A2等。

2 细胞学研究

植物的雄性不育不但在植物的外部形态上能够反映出来, 而且在植物发育的早期已经在植物细胞中出现各种异常变化。因此, 对不育花粉进行细胞学研究, 不但可以探讨其小孢子发育的细胞学变化, 而且可以为不育系的遗传分析和杂种优势的研究利用提供参考资料。

对于棉花“洞A”型雄性不育材料小孢子败育的细胞学研究, 许多学者都做了不少的工作。汤泽生等对“洞A”姊妹系的小孢子母细胞发育进行了比较观察, 发现可育株从造胞

基金项目 四川省育种攻关。

作者简介 唐雯(1983-), 女, 四川安岳人, 硕士研究生, 研究方向: 棉花遗传育种。* 通讯作者。

收稿日期 2007-09-21

细胞开始到小孢子成熟的各个阶段,其发育都是正常的;而不育株从小孢子母细胞到小孢子成熟的各个时期都产生不同程度的败育,但主要的败育时期为小孢子单核时期^[3-5]。小孢子母细胞形态正常,多数能通过减数分裂,有少部分小孢子母细胞在减数分裂时期退化,核分裂有畸形,产生大小不等的小孢子或畸形的小孢子。小孢子在单核早期产生严重障碍,表现为细胞质退化,核一般不分裂。对花药进行组织学观察,发现不育株花粉细胞质不饱满或稀少,花药壁的细胞发育缓慢,花药内壁的绒毡层细胞解体慢而且解体不彻底,致使小孢子的营养供应受阻。这也是小孢子败育的原因之一。不育株花粉中存在联体花粉粒。它是在四分孢子时期细胞质不分割形成的。对不育花粉进行萌发试验,发现多数花粉不萌发,有少数能萌发,但生长慢、花粉管短,不能进入子房。

刘金兰等以“洞A”型不育系和“洞A”不育株×MB(保持系)获得的完全核不育系MA为材料,研究了花粉发育不同时期的细胞形态,发现“洞A”两系核雄性不育株花粉在发育的全过程中都会发生败育,最早始于现蕾后第5天的花粉母细胞,大量败育在现蕾后的第7~8天,即花粉母细胞减数分裂前期,败育的主要表现是细胞质高度液泡化、出现“胞质穿壁”现象^[6]。在第10天的四分孢子中散出大量大小不齐、形态畸形的花粉粒。在第15~20天中,不育花中存在的单核和极少数双核花粉陆续败育。同时,采用石蜡切片扫描电镜技术^[7],对2个材料各时期败育花粉的超微形态结构进行了观察。结果表明,败育花粉母细胞外的胼胝质沉积过多,溶解较慢;单核期败育的花粉细胞质完全解体,但仍保留有不同程度解体的核,核内被一些大液泡占据,核膜仍清晰可见;败育花粉壁发育不完全,壁上的刺状突起小而稀,无萌发孔。不育株花药壁绒毡层生长过程中出现各种异常变化,是花粉壁不能正常形成的重要原因,可以认为花粉败育与绒毡层变化不正常是互为因果的,但根本原因还是受不育基因的控制。MA不育系花粉败育的时期和表现与“洞A”不育系基本相似,仅在时间上早1d左右。

3 生理生化研究

植物花药花粉的发育是一个复杂的过程。正常的生理生化代谢是植物花药花粉发育所需物质和能量的基础,因此研究育性表达过程中的生理生化代谢对雄性不育的生化机理探讨具有重要的意义。“洞A”型核雄性不育系花粉败育不但涉及植株外部形态和花粉细胞形态学上的异常,而且反映在其生化代谢上的改变。

胡瑞娟等对“洞A”型核雄性不育系不同时期花药内氨基酸含量的比较分析表明,不育花药的游离氨基酸总含量不断减少,水解蛋白质和结合氨基酸含量不断降低^[8]。这说明不育花药中的蛋白质正处在进行破坏性的分解过程中,特别是与育性有关的脯氨酸的降低,是造成败育的生理原因。宋宪亮等研究了“洞A”衍生不育系抗A1不育与可育花药和MA不同发育时期可溶性碳水化合物、游离氨基酸和激素(IAA、GA₃、ABA)含量的动态变化及其与雄性不育的关系^[9]。结果表明,不育花药中可溶性糖含量偏高,缺乏淀粉积累;有4种游离氨基酸含量在可育与不育花药间存在0.05水平显

著差异,其中不育花药天门冬氨酸含量偏高,可能是其败育的原因之一,而脯氨酸、精氨酸、苯丙氨酸含量异常,则是不育花药败育的结果;在花药主要败育时期之前,不育花药中ABA含量在0.01水平显著偏高,IAA、GA₃含量在0.01水平显著偏低,不育花药中IAA、GA₃、ABA含量变化与“洞A”型核雄性不育系花药败育密切相关。

4 分子生物学研究

目前,植物花粉发育的分子生物学已经成为植物分子生物学研究中的热点领域。花粉发育是一个十分复杂的过程。在这个过程中,涉及近万种花药特异基因的协同表达。在植物发育的主要阶段至少有60 000个结构基因表达,大多数为所有器官共有的看家基因(Housekeeping Gene)。Kanalay等比较了花和营养器官的mRNA后发现,约10 000个mRNA与花药特异性有关,它们的表达在营养器官中检测不到^[10-11]。这些花药特异性基因决定了花药组织的细胞分化状态。尽管在花粉发育过程中涉及近万种特异基因的表达,但是自Simson等从重组cDNA文库中第一次分离出植物的花药、花粉特异性基因^[12-13]以来,迄今所发现并得到鉴定的花粉发育特异基因也不过几十种^[14]。这些花粉特异基因在植物发育过程中的表达受时间和空间调节。除了某些持续表达的基因,Mascarenhas将花粉形成过程中的基因分成早晚2个时期。早期基因的转录在减数分裂后即可检测到,而在成熟花粉中减少或完全消失;晚期基因的转录最早发生于小孢子有丝分裂时期,并且随着花粉的成熟继续积累^[15]。一般认为,早期基因可能编码细胞骨架蛋白和参与细胞壁形成、淀粉积累的蛋白质。晚期基因表达的蛋白质则在花粉成熟和花粉萌发时起作用。因此,研究花药、花粉在发育过程中基因表达的时空特异性,分离相关的特异基因和特异启动子,对于认识植物花粉发育的分子机理有重要意义。雄性不育具体体现在花粉的败育,在花粉的发育过程中涉及上万种基因的表达。在这些表达的基因中,只要有一种关键的基因发生了突变或其表达调控出现异常,就有可能导致花粉的败育^[16-17]。棉花“洞A”的不育株与可育株除在育性上存在差异外,它们在遗传背景上是高度同源的,因此是研究棉花花药花粉发育相关基因的理想材料。

侯磊等应用cDNA AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)技术,分析了棉花“洞A”型雄性不育系和可育材料在花药发育过程中花粉发育相关基因表达的差异^[18]。结果表明,在花药发育的相同时期,不育和可育花粉cDNA AFLP的谱带在单核期的差异大于减数分裂期。花粉发育早期即花粉母细胞的减数分裂期,虽然从染色体行为上未观察到明显的变化,但在可育株与不育株花药mRNA表达上已经有差异产生,即不育株中基因的表达有减少的趋势,而且有些带虽未消失,但在表达量上也有所下降。这与王学德等在水稻雄性不育上的研究结果^[19]是一致的。这可能是由于在棉花花药发育过程中,某个关键的基因发生了突变,导致下游一系列基因的表达发生异常。随着花药花粉的发育,不育株与可育株间在花药表型上的差异越来越明显,以致在花粉成熟时期产生花药中无花粉的现象。而cDNA AFLP的结果也表明,在单核期不育与可育花药间的差异片段数、不育花药减

少的带纹数越来越多。这与发育的表现型是相关的。

5 存在的主要问题及对策

早期的花粉发育研究主要集中在对花粉发育一般的描述上。近年来,随着现代生物学技术和分子生物学技术在花粉生物学研究领域的广泛应用,花粉发育过程中一些关键问题、有关分子机理的研究均获得了重要进展。然而,对棉花的雄性不育、花粉发育的研究工作开展得较晚,研究相对落后。目前对“洞A”型核雄性不育系的花粉发育进行了一些研究,虽然已取得不少重要的进展,但仍存在一些尚待探究的问题。

(1) 在研究棉花花粉发育过程中减数分裂、生殖细胞和营养细胞的分化等关键问题时,分子技术和新的细胞生物学方法的应用不多。棉花基因组很大,从分子水平上研究也存在很多困难,并且生理生化基础研究较少,致使生理生化和分子生物学基础研究滞后,所以应多借鉴其他植物的研究方法,应用新的技术和方法加强对棉花花粉发育的研究。

(2) 对棉花细胞质的重组和细胞器。细胞壁形成之间的关系虽已有部分报道^[20],但系统研究还不够,所以应在棉花的花粉发育中开展进一步的研究工作。细胞质改组作为解释世代转变的一种细胞学机理,其实质是消除一些孢子体信息物质,使减数分裂后的孢子在更新的细胞质中发育成配子体。胼胝质、淀粉粒和细胞器三者的动态分布有一定的相似性,但它们之间是否存在内在联系,目前这方面的报道尚不多见,值得进一步研究。

(3) 在棉花不育系研究中,目前对与花粉发育有关的基因表达的研究工作进行得太少,未彻底弄清其遗传规律。目前已知在花粉发育中表达的基因可分为早晚2个时期。早期基因的转录在减数分裂后可检测到,而在成熟花粉中减少或完全消失;晚期基因的转录最早发生于小孢子有丝分裂时期,并且随着花粉的成熟继续累加。到目前为止,在棉花花粉败育研究中,对与发育有关基因的克隆和分析较少,所以应加强这方面的研究,有助于更好地了解花粉发育过程中的分子机理。

(4) 小孢子不对称分裂特异基因的分子机理仍有待进一步研究。小孢子第一次分裂在花粉发育过程中起着关键性的作用。在正常发育的花粉中,这次分裂是不对称的,其结果产生2个大小不等且具有不同结构和命运的细胞,即营养细胞和生殖细胞。而在不育花粉发育过程中,这次分裂却可能是对称的,形成2个同等大小的细胞。在营养细胞内特异

表达的基因在这2个细胞中表达,说明这2个细胞均具有营养细胞特性。因此,不对称分裂正是分化形成生殖细胞的必要条件,而对营养细胞的命运影响不大。大量资料表明,小孢子的不对称分裂和细胞的不同发育命运是花粉发育过程中特异基因表达的结果。目前,在对“洞A”型核雄性不育系的花粉发育研究中还未见对小孢子不对称分裂特异基因的报道,有关的分子机理也还需进一步研究。

(5) 洞A不育系花粉败育程度差异的机理也有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张天真,冯义军,潘家驹.我国发现的4个棉花核雄性不育系的遗传分析[J].棉花学报,1992,4(1):1-8.
- [2] 四川省南充师范学院生物系.棉花“洞A”兄妹系花器官的比较研究[J].科研资料汇编:自然科学版,1979(1):47-51.
- [3] 汤泽生,杜素琼,王祖秀,等.棉花“洞庭一号”姊妹系小孢子发育的细胞形态学研究[J].西华师范大学学报:自然科学版,1980(1):38-45.
- [4] 汤泽生,杜素琼,王祖秀,等.棉花“洞A”雄性不育小孢子败育的细胞学研究[J].中国农业科学,1981(5):47-51.
- [5] 汤泽生,杜素琼,王祖秀,等.棉花“洞A”小孢子发育的细胞形态学研究补遗[J].西华师范大学学报:自然科学版,1982(2):28-31.
- [6] 刘金兰,聂以春,黄观武,等.棉花“洞A”型核雄性不育材料花粉发育的细胞形态学观察[J].棉花学报,1994,6(2):70-73.
- [7] 刘金兰,聂以春,黄观武,等.“洞A”型核雄性不育材料花粉不同发育时期的超微结构观察[J].棉花学报,1994,6(4):193-195.
- [8] 胡瑞娟,何纪荣,何奕斌,等.棉花“洞A”雄性不育小孢子败育与蛋白质代谢关系的研究[J].西华师范大学学报,1985(1):43-50.
- [9] 宋宪亮,孙学振,王洪刚,等.棉花洞A型核雄性不育系花药败育过程中的生化变化[J].西北植物学报,2004,24(2):243-247.
- [10] KAMALAY J C, GOLDBERG R B. Regulation of structural gene expression in tobacco[J]. Cell, 1980, 19:935-946.
- [11] KAMALAY J C, GOLDBERG R B. Organ-specific nuclear RNAs in tobacco[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81:2801-2805.
- [12] SIMONSON R A. The molecular biology of differentiation[J]. Plant Science, 1987, 80:107-118.
- [13] GOLDBERG R B, BEARDS T P, SANDERS P M. Arther development: basic principles and practical applications[J]. Plant Cell, 1988, 5:1217-1229.
- [14] JONG SEONG J, YONG YOON C, SICHUL L, et al. Isolation and characterization of an arther-specific gene, RA8, from rice (Oryza sativa L.) [J]. Plant Mol Biol, 1999, 39:35-44.
- [15] MASCARENHAS J P. Gene activity during pollen development[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1990, 41:317-338.
- [16] FOURGOUX NICOLAS A, DROUARD J, HAOUAZINE N, et al. Isolation of rapeseed genes expressed early and specifically during development of the male gametophyte[J]. Plant Mol Biol, 1999, 40(5):857-872.
- [17] JOHN M E. Cotton (Gossypium hirsutum L.) pollen-specific polygalacturonase temporal specificity of its promoter in transgenic tobacco[J]. Plant Mol Biol, 1994, 26(6):1989-1993.
- [18] 侯磊,肖月华,李先碧,等.棉花洞A雄性不育系花药发育的mRNA差别显示[J].遗传学报,2002,29(4):359-363.
- [19] 王学德,朱英国.水稻雄性不育与可育花药的mRNA差别显示和cDNA差别片段的分析[J].中国科学(C辑),1998,28(3):257-263.
- [20] 王毅,胡适宜.棉花小孢子发生过程中细胞质的超微结构变化:着重“细胞质改组”问题[J].植物学报,1993,35(4):255-260.

(上接第1359页)

- [16] RAVANEL S, CHEREST H, JABRINS, et al. Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthase and three isoforms of dihydropyrimidine synthase in Arabidopsis thaliana[J]. Plant Biology, 2001, 98(26):15360-15365.
- [17] COSSINS E A, CHEN L F. Folate and one-carbon metabolism in plants and fungi[J]. Phytochemistry, 1997, 45:437-452.
- [18] HANSON A D, GAGE D A, SHACHAR HILL Y. Plant one-carbon metabolism and its engineering[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5:206-213.
- [19] HANSON A D, ROJE S. One carbon metabolism in higher plants[J]. Annual

Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52:119-137.

- [20] BOURGIGNON J, RE BELLE F, DOUCE R. Serine and glycine metabolism in higher plants[M]. Plant Amino Acids. New York: Marcel Dekker, 1999:111-146.
- [21] BOLAND M J, SCHUBERT K R. Biosynthesis of puines by a proplastid fraction from soybean nodules[J]. Arch Biochem Biophys, 1983, 220(1):179-187.
- [22] REYNOLDS P H S, BOLAND M J, BLEMNS D G, et al. Enzymes of aride and ureide biogenesis in developing soybean nodules[J]. Plant Physiol, 1982, 69(6):1334-1338.