

‘阳光玫瑰’雄性不育株花蕾发育期抗氧化酶活性和内源激素含量的变化

洪 奔, 陶建敏, 农慧兰, 徐颖一, 耿艺宁, 凌千惠, 郑 焕*

(南京农业大学 园艺学院, 南京 210095)

摘 要:以葡萄品种‘阳光玫瑰’及其实生后代雄性不育株‘Y-14’为试材,研究花蕾发育期抗氧化酶活性和内源激素含量的变化,阐明葡萄雄性不育新种质的生理生化特征。结果表明:(1)与‘阳光玫瑰’相比,雄性不育株‘Y-14’花蕾的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性显著降低,而丙二醛(MDA)含量显著增高。(2)‘Y-14’花蕾的生长素(IAA)含量高于‘阳光玫瑰’,而脱落酸(ABA)含量显著低于‘阳光玫瑰’;‘Y-14’花蕾的赤霉素含量(GA₃)在花蕾发育前期低于‘阳光玫瑰’,而其茉莉酸甲酯(MeJA)在后期显著低于‘阳光玫瑰’;‘Y-14’花蕾的反式玉米素核苷(TZR)含量较‘阳光玫瑰’偏低。(3)在单核早期,‘Y-14’花蕾的ABA含量变化平缓,而‘阳光玫瑰’的ABA含量急剧升高,与此同时GA₃含量开始高于‘阳光玫瑰’,而MeJA含量则在单核早期低于‘阳光玫瑰’且差异逐渐显著。研究认为,‘阳光玫瑰’实生后代不育株‘Y-14’花蕾发育期SOD、POD、CAT活性和MDA、IAA、ABA、GA₃、MeJA含量异常变化可能导致了雄性不育的发生,而且单核早期可能是‘Y-14’雄性不育产生的关键时期。

关键词:葡萄;雄性不育;抗氧化酶;内源激素;ESI-HPLC-MS/MS

中图分类号:Q945.6⁺2; S663.1 **文献标志码:**A

Analysis of Antioxidant Enzymes Activities and Endogenous Hormone Contents in Male Sterile Plant of ‘Shine Muscat’ Seeding during Bud Development

HONG Ben, TAO Jianmin, NONG Huilan, XU Yingyi, GENG Yining,
LING Qianhui, ZHENG Huan*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The seedling male sterile plants ‘Y-14’ and ‘Sunshine Muscat’ were used as test materials to study the changes of antioxidant enzyme activity and endogenous hormone contents during the bud development period, for demonstrating the physiological and biochemical characteristics of male sterility in grapes. The results showed that: (1) compared with ‘Sunshine Muscat’, the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) in the buds of ‘Y-14’ were significantly reduced, while the content of malondialdehyde (MDA) increased significantly. (2) The content of auxin (IAA) in

收稿日期:2021-09-07;修改稿收到日期:2021-12-31

基金项目:国家自然科学基金(31901975);中国博士后科学基金(2019M651858);国家现代农业葡萄产业技术体系(CARS-29);江苏农业产业技术体系(JATS[2021]450);江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201723);国家重点研发计划(2020YFD1000204)

作者简介:洪 奔(1997—),男,在读硕士研究生,主要从事果树生理生化研究。E-mail:837548818@qq.com

* 通信作者:郑 焕,讲师,主要从事葡萄栽培育种及分子技术的研究。E-mail:taojianmin@njau.edu.cn

‘Y-14’ was higher than that in ‘Sunshine Muscat’, and the content of abscisic acid (ABA) was significantly lower than ‘Sunshine Muscat’; In the early stage of bud development, the content of gibberellin (GA_3) in ‘Y-14’ is lower than ‘Sunshine Muscat’, while methyl jasmonate (MeJA) is significantly lower than ‘Sunshine Muscat’ in the later stage; the content in ‘Y-14’ *trans*-Zeatin Nucleoside (TZR) is lower than that in ‘Sunshine Muscat’. (3) In the early mononuclear stage, the content of ABA in ‘Y-14’ changed smoothly while the ‘Sunshine Muscat’ increased sharply. At the same time, the content of GA_3 began to be higher than that in ‘Sunshine Muscat’, while the MeJA began to be lower than ‘Sunshine Muscat’ in the early mononuclear stage. And it showed gradually significant difference. In summary, the abnormal changes of SOD, POD, CAT activities and MDA, IAA, ABA, GA_3 , MeJA contents may have led to the male sterility. The early mononucleus period may be the critical period for the male sterility of ‘Y-14’.

Key words: grape; male sterility; antioxidant enzymes; endogenous hormones; ESI-HPLC-MS/MS

葡萄是重要的果树经济作物,在世界农业中占有重要地位,雄性不育在提高水果无核品质、增加产量、商业化批量杂交育种等方面尤为重要^[1]。葡萄雄性不育系因其单性结实的特性可培育无核品种,同时在杂交育种中作为母本免去人工去雄这一过程,可极大提高育种效率^[2]。因此,研究和应用雄性不育对葡萄雄性不育新种质的合理开发与利用具有重要意义。

植物雄性不育的发生过程中通常伴随着异常的生理代谢特征。冯小磊^[3]认为植物雄性不育的生理生化特性研究可将植物遗传与个体表型变异联系起来,有助于揭示植物雄性不育发生机理。近年来,不少学者在膜脂过氧化和内源激素方面对植物雄性不育材料的生理生化机制进行了研究,取得了一系列新进展。活性氧在植物中的积累被认为是雄性不育产生的重要原因之一。它可以使细胞膜中不饱和脂肪酸发生过氧化或脱脂化,逐级降解为MDA,一般认为MDA在植物体内积累是活性氧毒害的表现,其含量是判断膜脂过氧化程度的一个重要指标。植物在长期演化过程中形成了防御活性氧的保护机制,其中抗氧化酶系统发挥至关重要的作用^[4]。高羊茅^[5]、百合^[6]、厚轴茶^[7]等植物不育株花蕾发育过程中POD、SOD、CAT等抗氧化酶活性较可育株表现出不同程度的差异,而花蕾发育阶段MDA含量通常高于可育株。前人普遍认为在雄性不育发生过程中会产生大量的活性氧,导致MDA升高,可能是植物败育的一个重要原因^[8]。另外,植物内源激素参与细胞、组织、器官分化、开花与结实、成熟与衰老、休眠与萌发等诸多方面生理活动,单独或协同调控植物的生长发育过程。目前,大量研究表明植物花蕾不同发育时期内源激素含量发生变化,都将影响植物自身花药育性,造成雄性不育^[9]。茄子^[10]、大豆^[11]等作物雄性不育研究结果表明,不育系花器

官发育过程中IAA、ABA、 GA_3 、CTK、JA、BR等内源激素含量异常以及内源激素平衡失调与雄性不育的发生紧密相关。

‘阳光玫瑰’葡萄为欧美杂交种。该品种生长势强、抗病性强、丰产质优、口感香甜、市场认可度高。‘Y-14’为南京农业大学选育的4株‘阳光玫瑰’实生后代雄性不育优良单株,于2017年定植,有性繁殖;其雄蕊花丝极短,且紧紧包裹雌蕊不易开裂(图1),花粉无活力;自然授粉果穗大小粒现象严重,无核率达96%,花前套袋为全无核果实。目前,关于葡萄雄性不育材料生理生化方面的研究较少。本研究以‘阳光玫瑰’实生后代雄性不育株‘Y-14’和‘阳光玫瑰’各发育期花蕾为试材,测定花粉母细胞时期、减数分裂时期、四分体时期、单核早期、单核晚期、二核期、成熟花粉粒时期的抗氧化酶活性和内源激素含量,从而揭示葡萄不育株‘Y-14’膜脂过氧化、内源激素含量与雄性不育之间的关系,阐明葡萄雄性不育的生理代谢特征,为葡萄雄性不育新种质的合理开发与利用提供理论依据。

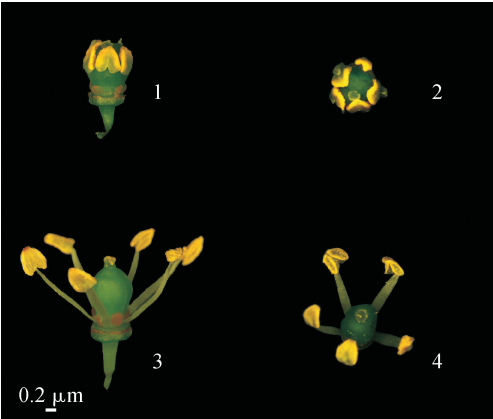
1 材料和方法

1.1 试验地点与材料

以南京农业大学汤山翠谷葡萄基地的‘阳光玫瑰’实生后代雄性不育株(编号‘Y-14’)和‘阳光玫瑰’为实验材料(图1)。从2021年4月下旬幼蕾期开始采集花蕾至5月中上旬开花为止,每3d采集1次,液氮速冻,−80℃冰箱保存;将花蕾分为花粉母细胞时期、减数分裂期、四分体期、单核早期、单核晚期、二核期及成熟花粉粒时期。

1.2 测定项目

花蕾样品POD、CAT、SOD活性和MDA含量采用试剂盒测定。试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司,样品的处理及各项指标测定均按照试剂盒



1. ‘Y-14’正视图;2. ‘Y-14’俯视图;3. ‘阳光玫瑰’正视图;
4. ‘阳光玫瑰’俯视图

图1 ‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花器官外观形态
(日期:2021 年 5 月 15 日)

1. Front view of ‘Y-14’; 2. Top view of ‘Y-14’; 3. Front view
of ‘Shine-Muscat’; 4. Top view of ‘Shine-Muscat’

Fig.1 The flower of ‘Y-14’ compared with Shine-Muscat
(Date:15-May-2021)

使用说明书进行,每个样品重复测定 3 次。

花蕾样品内源激素含量的定性定量分析采用 ESI-HPLC-MS/MS 法。以异丙醇-水-盐酸提取植物样品内源性激素(endogenous phytohormones),以安捷伦(Agilent)1290 高效液相色谱仪串联 AB Sciex QTRAP 6500+质谱仪测定植物内源性激素 IAA、ABA、反式玉米素核苷(TZR)、茉莉酸甲酯(MeJA)、GA₃ 含量,并在提取过程中加入内标物质校正检测结果。(1)标准溶液配制:以甲醇(0.1%甲酸)为溶剂配制浓度梯度为 0.1、0.2、0.5、2、5、20、50 和 200 ng/mL 的 IAA、ABA、TZR、MeJA、GA₃ 标准溶液,并加入终浓度为 20 ng/mL 的内标溶液,在实际绘制标准曲线方程时剔除线性异常点。(2)液相条件:色谱柱:Poroshell 120 SB-C₁₈反相色谱柱(2.1×150,2.7 μm);柱温:30 ℃;流动相:A:B=(甲醇/0.1%甲酸):(水/0.1%甲酸);洗脱梯度:0~1 min,A=20%;1~9 min,A 递增至 80%;9~10 min,A=80%;10~10.1 min,A 递减至 20%;10.1~15 min,A=20%;进样体积:2 μL。(3)质谱条件:电喷雾电离源 ESI(electron spray ionization)雾化温度:400 ℃;气帘气(curtain gas,CUR):15 psi;喷雾电压(ion spray voltage,IS):4 500 V;雾化气压力(Gas1):65 psi;辅助气压力(Gas2):70 psi;监测模式:MRM(多反应监测模式 multiple reaction monitoring)。在 Q-Trap6500 中,每个离子对是根据优化的去簇电压(decustering potential,DP)和

碰撞能(collision energy,CE)进行扫描检测。

1.3 数据处理

GraphPad Prism 8.0.1 使用 Analyst 及 Graph-Pad Prism 8.0.1 进行处理数据及数据分析,Excel 2019 作图。

2 结果与分析

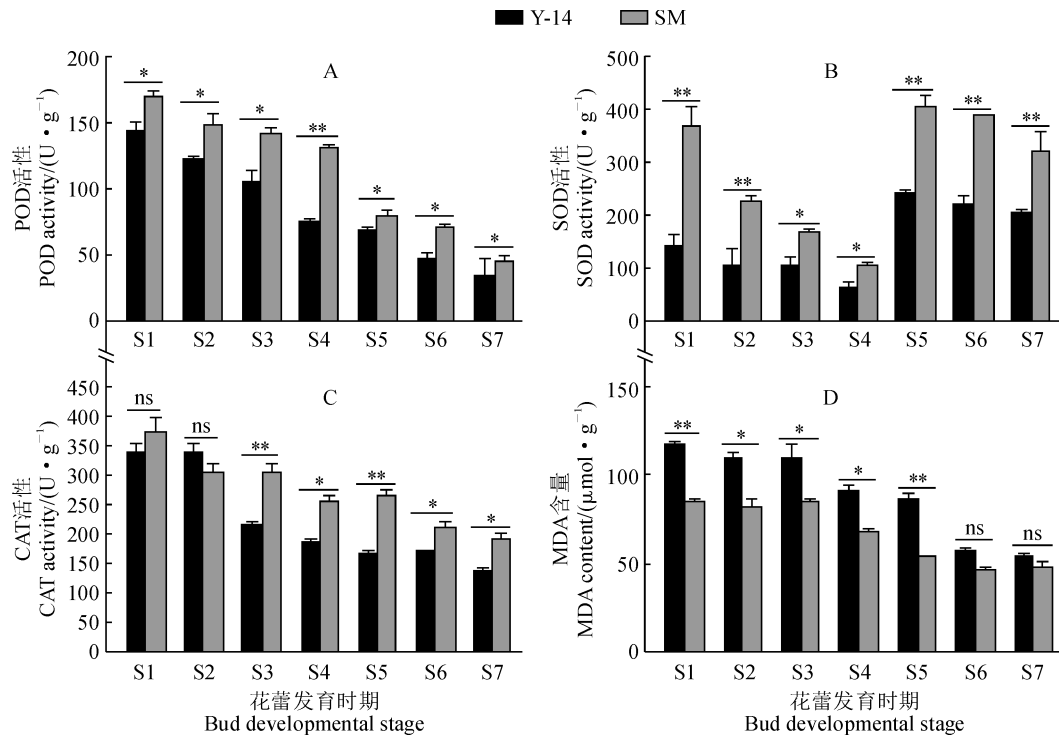
2.1 ‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾各发育时期抗氧化酶活性及 MDA 含量比较

2.1.1 POD 活性 ‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾 POD 活性随着花蕾发育时期总体呈逐步下降趋势(图 2,A)。其中,各发育时期‘Y-14’花蕾 POD 活性都显著低于‘阳光玫瑰’POD 活性;‘Y-14’与‘阳光玫瑰’的 POD 活性差异较大时期集中出现在花蕾发育的四分体时期(S3)和单核早期(S4),此时‘Y-14’POD 活性分别为同期‘阳光玫瑰’的 75.71% 和 57.31%。

2.1.2 SOD 活性 图 2,B 显示,‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾 SOD 活性在花蕾发育时期总体上呈先下降后上升趋势。其中,‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾 SOD 活性均单核早期(S4)最低;整个花蕾发育过程中,‘Y-14’SOD 活性始终显著低于同期‘阳光玫瑰’,并分别以花粉母细胞时期(S1)和单核早期(S4)差异最大和最小,分别占同期‘阳光玫瑰’的 37% 和 59.21%。

2.1.3 CAT 活性 如图 2,C 所示,‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾 CAT 活性在花蕾发育时期总体上呈缓慢下降趋势,‘Y-14’在四分体时期(S3)有骤降现象。其中,‘Y-14’花蕾 CAT 活性除减数分裂期略高于‘阳光玫瑰’外,其余时期均低于‘阳光玫瑰’,且除花粉母细胞期(S1)和减数分裂期(S2)外,两者差异均达到显著水平;‘Y-14’花蕾的 CAT 活性与‘阳光玫瑰’差异在花蕾发育四分体期、单核早期、单核晚期更为明显,分别占同期‘阳光玫瑰’的 70.41%、71.92%和 63.36%。

2.1.4 MDA 含量 ‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾的 MDA 含量在花蕾发育过程中呈逐步下降的趋势,且总体而言,‘Y-14’花蕾的 MDA 含量要始终明显高于同期‘阳光玫瑰’(图 2,D)。其中,‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾的 MDA 含量均在单核晚期至二核期下降幅度较大;在花粉母细胞时期(S1)和单核晚期(S5),‘Y-14’与‘阳光玫瑰’之间的 MDA 含量差异尤为明显,‘Y-14’MDA 含量分别为同期‘阳光玫瑰’的 1.38 倍和 1.34 倍。



* 表示差异显著($P<0.05$), ** 表示差异极显著($P<0.01$); S1. 花粉母细胞期;S2. 减数分裂期;S3. 四分体期;S4. 单核早期; S5. 单核晚期;S6. 二核期;S7. 成熟花粉粒期;下同

图2 ‘Y-14’与‘阳光玫瑰’(SM)花蕾发育期抗氧化酶活性及MDA含量的变化

* represents a significant difference ($P<0.05$), ** represents a very significant difference ($P<0.01$). S1. Pollen mother cells; S2. Meiosis; S3. Tetrad; S4. Early mononuclear; S5. Late mononuclear; S6. Binuclear; S7. Mature pollen grains; The same as below

Fig. 2 Changes of the activity of antioxidant enzymes and MDA content in bud developmental stages in grape ‘Y-14’ and ‘Sunshine Muscat’(SM)

以上结果说明‘Y-14’各发育时期抗氧化酶活性总体上低于‘阳光玫瑰’,而MDA含量高于‘阳光玫瑰’,说明‘Y-14’较‘阳光玫瑰’膜脂过氧化程度更严重。两材料花蕾POD与CAT活性总体上呈下降趋势,POD活性从花蕾发育早期即差异显著,而CAT活性在四分体期差异极显著;两材料花蕾SOD活性均在单核早期达到最低,然后在单核早期突然上升,且各时期均差异显著。

2.2 ‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾发育期内源激素含量变化特征

2.2.1 IAA含量 如图3,A所示,在葡萄花蕾发育过程中,‘Y-14’花蕾IAA含量始终不同程度地高于同期‘阳光玫瑰’,但仅在花粉母细胞时期、四分体时期和单核早期差异达到显著水平;‘Y-14’花蕾IAA含量总体呈下降趋势,‘阳光玫瑰’花蕾IAA含量变化趋势不明显。其中,‘Y-14’花蕾IAA含量在四分体时期达到最大值,而‘阳光玫瑰’IAA含量在单核早期达到最大值;‘Y-14’的IAA含量在花粉母细胞时期、四分体时期与‘阳光玫瑰’表现出显著差异,分别是同期‘阳光玫瑰’的1.80倍、1.46倍。

2.2.2 GA₃含量 ‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾GA₃含量在花蕾发育过程中均呈先上升后下降的变化趋势(图3,B)。其中,‘Y-14’花蕾GA₃含量在花蕾发育前期(S1~S3)低于‘阳光玫瑰’,在单核早期(S4)开始高于‘阳光玫瑰’含量,但在S1~S4期间两者间差异均未达到显著水平;Y-14’花蕾GA₃含量在单核期(S5)和二核期(S6)显著高于同期‘阳光玫瑰’($P<0.05$),并以二核期差异最大,此时‘Y-14’GA₃含量是‘阳光玫瑰’的1.84倍;‘Y-14’GA₃含量在花粉成熟期(S7)又明显降低,稍低于同期‘阳光玫瑰’。

2.2.3 ABA含量 ‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾ABA含量在花蕾发育过程中总体呈上升趋势,‘阳光玫瑰’ABA含量在单核早期(S4)显著大幅上升,但‘Y-14’ABA含量的变化相对比较平缓(图3,C);在花蕾整个生长发育过程中,‘Y-14’花蕾ABA含量始终显著低于同期‘阳光玫瑰’,且在花粉母细胞时期就达到极显著水平,此时仅为‘阳光玫瑰’的23.42%。

2.2.4 TZR含量 图3,D显示,‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾TZR含量在花蕾发育期总体上变化平缓且普遍含量较低(0.05 ng/g左右),‘Y-14’TZR含量

始终低于同期‘阳光玫瑰’,但它们之间在各发育时期始终差异不显著。

2.2.5 MeJA 含量 在花蕾发育过程中,‘Y-14’花

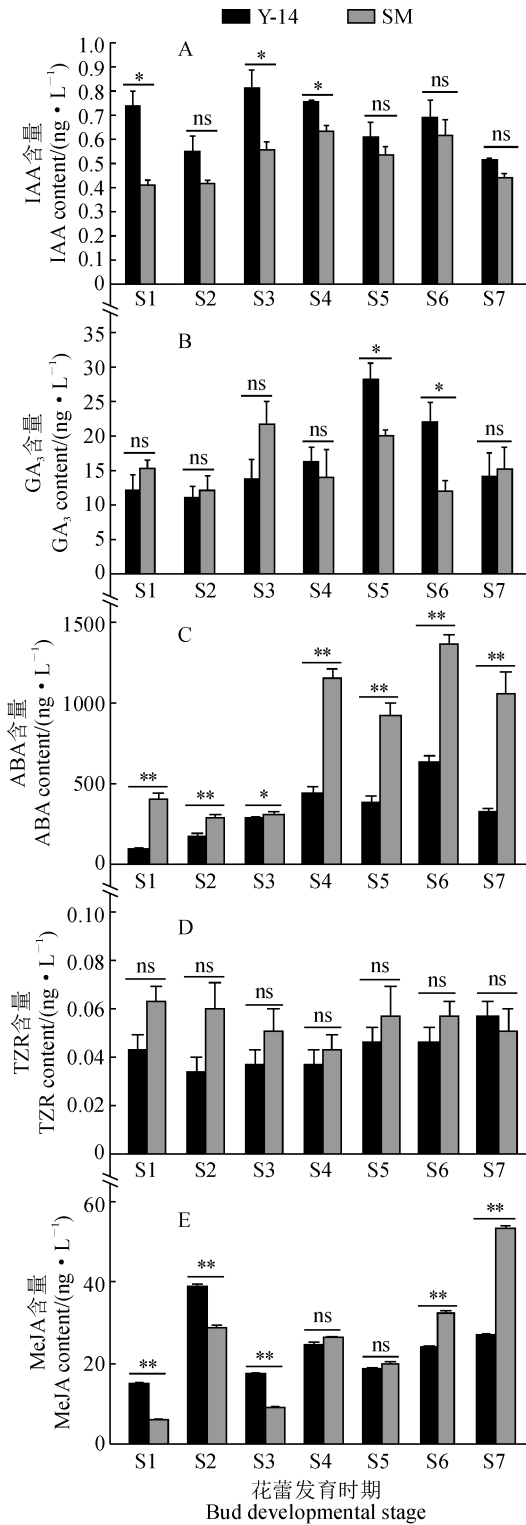


图3 ‘Y-14’与‘阳光玫瑰’花蕾发育期内源激素含量的变化
Fig. 3 Changes of the endogenous hormone content in bud developmental stages in grape ‘Y-14’ and ‘Sunshine Muscat’

蕾 MeJA 含量总体呈升高-降低交替变化的趋势,并在减数分裂期达到最高,而‘阳光玫瑰’花蕾 MeJA 含量总体呈上升趋势,并在花粉母细胞时期最低,在成熟花粉粒时期达到最高(图 3, E)。

‘Y-14’花蕾 MeJA 含量在花蕾发育前期明显高于同期‘阳光玫瑰’,并在花粉母细胞时期差异极显著水平,是同期‘阳光玫瑰’的 2.56 倍;从单核早期(S4)开始,‘Y-14’花蕾 MeJA 含量均不同程度地低于同期‘阳光玫瑰’,并且其间差异随着发育时期越来越明显,在二核期和花粉成熟期均达到极显著水平。

以上结果说明整个花蕾发育期以 ABA 的含量在‘Y-14’与‘阳光玫瑰’间差异尤其显著,ABA 在葡萄花蕾中具有一定的组织特异性。

‘Y-14’花蕾 IAA 含量在花蕾发育过程中高于‘阳光玫瑰’,与 ABA 呈一定程度负相关。

‘Y-14’的 MeJA 与 ABA 含量在花粉发育后期均极显著低于‘阳光玫瑰’,而 GA₃ 含量在花粉发育中后期略高于‘阳光玫瑰’,与 ABA 存在一定程度负相关。

‘Y-14’和‘阳光玫瑰’的 TZR 含量普遍偏低(0.05 ng/g 左右)且无显著差异,就本研究结果来看,TZR 含量变化与‘Y-14’雄性不育的形成无直接关系。

3 讨 论

3.1 ‘阳光玫瑰’葡萄雄性不育与膜脂过氧化的关系

活性氧能引起脂类、蛋白质、DNA 等生物大分子的损伤,其在植物中的积累被认为是导致雄性不育的重要原因之一^[3]。MDA 是脂质过氧化终产物,一般认为 MDA 在植物体内积累是活性氧毒害的表现,它的含量是判断膜脂过氧化程度的一个重要指标^[12]。SOD、POD、CAT 是植物抗氧化酶系统的主要成分,其中 SOD 的主要功能是催化 O₂⁻ 生成 H₂O₂,而 POD 与 CAT 协同清除 H₂O₂^[13]。SOD、POD、CAT 三者对维持植物活性氧动态平衡,防止 MDA 过度积累,抵御膜脂过氧化,促使植物正常生长发育具有重要意义^[14]。前人研究表明,植物雄性不育现象与膜脂过氧化及保护酶系统密切相关。据报道,西瓜不育系花蕾中 MDA 显著积累且呈现升高趋势,其 POD 与 SOD 活性也高于可育系^[15];无籽刺梨的 SOD 活性均低于刺梨,而其 MDA 含量和 POD 活性均高于刺梨^[16];高羊茅不育系 SOD 和 CAT 活性也显著低于同时期的可育系,但其 MDA 含量和 POD 活性却始终高于可育系^[5]。冯小磊等认为 SOD 和 CAT 的活性降低可能是导致一些作

物雄性不育的真正原因^[3],而榨菜、王百合、花椰菜不育系的保护酶活性要比可育系高,这种结果被认为是不育系应对膜脂过氧化的保护反应^[17]。

在本研究中,不育系‘Y-14’花蕾 MDA 含量在整个花蕾发育过程中明显高于‘阳光玫瑰’,而其 SOD、POD、CAT 活性总体低于‘阳光玫瑰’。此外,‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾的 MDA 含量都在花蕾发育前期最高而后总体呈下降趋势,这可能与其 SOD 活性在花蕾发育中期突然升高有关。SOD 作为植物细胞中最主要的抗氧化酶,其作为抗氧化酶防御系统的第一道防线,加之较其他抗氧化酶更为稳定的特点^[18],其活性变化往往直接影响 MDA 的含量。由此可见,‘Y-14’和‘阳光玫瑰’葡萄本身抗氧化酶防御系统亦存在一定的应激反应。综上,本研究中‘Y-14’花蕾的抗氧化酶系统活性较‘阳光玫瑰’降低,而其 MDA 含量升高,可能是造成‘Y-14’败育的原因;同时,‘Y-14’与‘阳光玫瑰’抗氧化酶系统中 SOD 活性差异最为显著,推测 SOD 活性是影响‘阳光玫瑰’实生后代雄性不育的关键。这与其他一些作物雄性不育研究类似,但也存在与之相反的结论。如刘倩在‘魏可’葡萄研究中发现不育株 SOD 活性高于可育株^[19]。因此,即使在相同物种的不同品种中,相关研究结论也不尽相同,这可能与植物种类、不育发生关键时期,甚至栽培条件与生长条件均有关。

3.2 ‘阳光玫瑰’葡萄雄性不育与内源激素的关系

植物通过内源激素调控能量代谢、物质代谢、信号传导以及基因表达等诸多方面,内源激素平衡维持植物正常的生理活动,保证植物正常的生长发育^[20]。迄今为止,大量研究表明植物内源激素如 IAA、GA₃、ABA、CK、JA、BR 等与雄性不育的发生密切相关,相关内源激素含量过高或是过低都会引起植物雄性不育^[13]。本研究所测的 5 种内源激素中,整个花蕾发育期以 ABA 的含量在‘Y-14’与‘阳光玫瑰’间差异尤其显著。研究表明:ABA 可诱导植物体内相关酶的重新合成来提高植物的抗逆性^[31],在小麦的研究中发现 ABA 可以显著提升小麦抗氧化酶(POD、SOD 和 CAT)活性^[21]。故推测‘Y-14’花蕾 ABA 含量较低导致了抗氧化酶活性的降低,加剧了‘Y-14’的膜脂过氧化,最终导致雄性不育。这与‘魏可’葡萄不育株中的研究结果一致^[22]。然而,也有大量研究表明 ABA 含量过高会影响维管系统的发育,促使营养物质转运受抑制,小孢子母细胞因营养匮乏发育受阻,从而造成雄性不

育^[7]。刘红艳认为 ABA 盈积可能会伴随着花粉母细胞的衰老和死亡,导致花粉败育和雄性不育的发生^[23]。这一观点与西瓜^[24]小麦^[25]的研究结果类似。马艳青认为同一内源激素在不同的作物种类中与雄性不育的关系表现并不一致,不同的植物或不育源可能存在不同的调控基因^[26],因此推测葡萄雄性不育发生与 ABA 含量关系具有物种特异性。

前人普遍认为 IAA 的亏损会导致植物维管束的异常发育,影响营养物质在花药的正常分配,从而导致雄性不育^[27]。研究发现小麦^[27]、西瓜^[24]等植物中不育系 IAA 含量均低于可育系。本研究结果却与之相反,‘Y-14’花蕾 IAA 含量在花蕾发育过程中显著高于‘阳光玫瑰’,这可能与 ABA 能抑制 IAA 的合成有关,‘阳光玫瑰’花蕾 ABA 含量较高导致了 IAA 含量的降低。也有研究表明 POD 活性升高可能会导致 IAA 的分解^[7],‘阳光玫瑰’POD 活性较高也可能导致了 IAA 含量的降低。另外,在百合^[6]、水稻^[3]、油菜^[28]多项研究中发现不育株 IAA 含量高于可育株。这可能是因为高浓度的 IAA 可诱导乙烯过量合成,进而促进雄性表达或诱导雄性不育^[29]。

GA₃ 是一种活性最高的赤霉素类激素。研究表明,GA₃ 可促进雄花分化,在大白菜^[30]、葡萄^[22]、西瓜^[24]等多种作物中,不育株 GA₃ 含量在花蕾各发育时期均低于可育株。在本研究中,‘Y-14’花蕾发育前中期 GA₃ 含量低于‘阳光玫瑰’,与前人结果类似;但花蕾发育后期‘Y-14’含量高于‘阳光玫瑰’,这种 GA₃ 含量变化情况与厚轴茶中研究结果类似^[7],故推测‘Y-14’花蕾 GA₃ 含量在花蕾发育前期和发育后期异常变化可能导致花粉母细胞发育异常,从而影响了‘阳光玫瑰’实生后代雄性不育。

MeJA 最先在拟南芥中被证明与花药开裂有关^[31],随后在水稻、小麦等大量研究中发现与雄性不育密切相关^[32-33]。拟南芥雄性不育突变体中花药不能正常开裂,同时出现 JA 含量低、花丝伸长受到抑制的现象^[34]。本研究中‘Y-14’在花蕾发育后期 MeJA 含量显著降低的现象与上述研究结果类似。郭航认为 JA 是诱导花丝伸长、花药开裂的信号分子,在花药开裂过程中起着重要的作用,JA 途径中任何阶段的缺陷都会引起类似花丝伸长减少、花药开裂延迟或不开裂的表型^[35]。‘Y-14’花丝萎缩、花药粘连不易开裂,推测可能由于 MeJA 含量的异常变化以及花蕾发育后期 MeJA 含量的含量较低,未能及时诱导花丝伸长,花药开裂,从而出现雄

性不育。

ZR 是植物体内普遍存在的一种细胞分裂素,其具有顺式和反式两种形式,即 T-trans 和 C-cis,其中反式(TZR)生物活性远高于顺式(CZR)^[20]。前人的研究表明植物花药发育过程中 ZR 含量过高或过低均可能导致雄性不育的发生。但在本研究中,‘Y-14’和‘阳光玫瑰’的 TZR 含量普遍偏低(0.05 ng/g 左右)且无显著差异,就本研究结果来看,TZR 含量变化与‘Y-14’雄性不育的形成无直接关系。

梨^[36]、葡萄^[37]、水稻^[38]、辣椒^[39]、厚轴茶^[40]等作物大量细胞学研究表明,单核期是植物发生雄性不育的关键时期。在本研究中,‘阳光玫瑰’花蕾 ABA 含量在单核早期剧增,而同期‘Y-14’变化平缓;‘Y-14’和‘阳光玫瑰’花蕾 SOD 活性均在单核早期最低,均在单核晚期剧烈升高。ABA 作为应激激素可能在单核早期影响了抗氧化酶尤其是 SOD 的活性^[20-21]。推测在单核早期 SOD 活性的降低引发了植物自身的应激响应使得 ABA 含量提升,接

着 ABA 又引导了 SOD 的重新合成;而由于‘Y-14’花蕾 ABA 含量变化迟缓,导致 SOD 活性未能及时提高,加剧了膜脂过氧化,最终引发了雄性不育。另外,‘Y-14’花蕾 MeJA 含量在花蕾发育前期高于‘阳光玫瑰’,在单核早期开始低于‘阳光玫瑰’且差异愈发明显,这一变化趋势与 BNS 小麦类似^[25]。‘Y-14’花蕾 GA₃ 含量也在单核早期开始高于‘阳光玫瑰’。因此推测单核早期可能是‘阳光玫瑰’实生后代雄性不育株花蕾生理生化出现异常的关键时期,这与厚轴茶相关生理生化研究中的结论一致^[7]。

综上所述,‘阳光玫瑰’实生后代雄性不育株‘Y-14’花蕾的 SOD、POD、CAT 活性显著降低,MDA 含量增高;其花蕾内源激素 ABA、MeJA 含量降低,IAA 含量增高,GA₃ 含量异常波动,可能与雄性不育的发生有关。‘Y-14’花蕾发育至单核早期,多项指标出现显著变化,单核早期可能是‘Y-14’生理生化出现异常的关键时期。但其中的雄性不育具体机制,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 崔梦杰,王 晨,张文颖,等. 无核葡萄研究进展[J]. 植物生理学报, 2017, **53**(3): 317-330.
CUI M J, WANG C, ZHANG W Y, *et al.* Research progress of seedless grape[J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, **53**(3): 317-330.

[2] 靳月琴,常 丽,王晓芳,等. 葡萄无核形成与调控机制研究进展[J]. 山西农业科学, 2020, **48**(9): 1 537-1 542+1 546.
JI Y Q, CHANG L, WANG X F, *et al.* Research progress of grape seedless formation and regulation mechanism [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2020, **48**(9): 1 537-1 542+1 546.

[3] 冯小磊,范光宇,苏 旭,等. 植物雄性不育生理生化研究进展[J]. 作物杂志, 2012,(3): 6-11.
FENG X L, FAN G Y, SU X, *et al.* Advances in physiology and biochemical study on plant male sterility [J]. *Crops*, 2012,(3): 6-11.

[4] 魏 婧,徐 畅,李可欣,等. 超氧化物歧化酶的研究进展与植物抗逆性[J]. 植物生理学报, 2020, **56**(12): 2 571-2 584.
WEI J, XU C, LI K X, *et al.* Progress on superoxide dismutase and plant stress resistance [J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, **56**(12): 2 571-2 584.

[5] 陈 伟,付 薇,吴佳海,等. 高羊茅雄性不育小孢子败育的细胞学及生理生化特性[J]. 植物生理学报, 2017, **53**(9):

1 761-1 771.
CHEN W, FU W, WU J H, *et al.* Cytology, physiological and biochemical characterization in microspore abortion of male sterile plant in *Festuca arundinacea*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, **53**(9): 1 761-1 771.

[6] 贾文杰,郑 洁,崔光芬,等. 百合育性与花药发育过程中激素和内源物质含量及能量代谢酶活性的关系[J]. 西北植物学报, 2019, **39**(3): 480-488.
JIA W J, ZHENG J, CUI G F, *et al.* Relationships between *Lilium* fertility and hormone, endogenous substance content, energy metabolism enzyme activity during anther development [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, **39**(3): 480-488.

[7] 蒋会兵,许 燕,宋维希,等. 厚轴茶雄性不育株花蕾发育过程中的生理生化变化[J]. 植物生理学报, 2020, **56**(9): 1 807-1 817.
JIANG H B, XU Y, SONG W X, *et al.* Physiological and biochemical changes during bud development in male sterile plant of *Camellia crassicolumna* in the flower of Pseudo-shaftii Tea[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, **56**(9): 1 807-1 817.

[8] 范彦君,蔡训辉,刘齐元,等. 烟草雄性不育研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, **33**(35): 70-76.
FAN Y J, CAI X H, LIU Q Y, *et al.* Research progress of

- male sterility in tobacco [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, **33**(35): 70-76.
- [9] 王文然, 樊秀彩, 王 晨, 等. 果树雄性不育的研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, **17**(1): 245-254.
- WANG W R, FAN X C, WANG C, *et al.* Research progress on male sterility in fruit crops[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, **17**(1): 245-254.
- [10] 丁泽琴. 茄子功能性雄性不育的细胞学及内源激素变化研究[D]. 重庆:西南大学, 2014.
- [11] 孙佳尧, 李资文, 崔天宇, 等. 大豆不育系花器官发育过程中内源激素动态变化研究[J]. 大豆科学, 2020, **39**(6): 891-897.
- SUN J Y, LI Z W, CUI T Y, *et al.* Dynamic changes of endogenous hormones in flower organ development of soybean sterile lines[J]. *Soybean Science*, 2020, **39**(6): 891-897.
- [12] 张丽华, 石 磊, 李素华, 等. 高温胁迫下 3 种多肉植物的生理指标变化及其适应性评价[J]. 安徽农学通报, 2021, **27**(12): 10-12+158.
- ZHANG L H, SHI L, LI S H, *et al.* Changes of physiological indexes and adaptability of three Succulents plants under high temperature stress [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2021, **27**(12): 10-12+158.
- [13] 杨淑慎, 高俊凤. 活性氧、自由基与植物的衰老[J]. 西北植物学报, 2001, **21**(2): 215-220.
- YANG S S, GAO J F. Influence of active oxygen and free radicals on plant senescence[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2001, **21**(2): 215-220.
- [14] OBRIEN J A, DAUDI A, BUTT V S, *et al.* Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism[J]. *Planta*, 2012, **236**(3): 765-779.
- [15] 王永琦. 西瓜核雄性不育两用系 Se18 不育特性的生理生化与分子机制研究[D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学, 2020.
- [16] 陈兴银, 石建明, 彭昌琴, 等. 雄性不育无籽刺梨花药发育过程中生理特性的初步研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2018, **26**(6): 604-610.
- CHEN X Y, SHI J M, PENG C Q, *et al.* Studies on physiological and biochemical characters of male sterile rosa sterilis during anther development stage[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2018, **26**(6): 604-610.
- [17] 袁建玉. 不结球白菜 CMS 新种质细胞学及生理生化特性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2005.
- [18] 冯 坤, 郑青松, 俞佳虹, 等. 超氧化物歧化酶的遗传特征及其在植物抗逆性中的研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, **15**(11): 4 498-4 505.
- FENG K, ZHENG Q S, YU J H, *et al.* The characteristics of superoxide dismutase (SOD) in the evolutions and its research in plant resistance[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, **15**(11): 4 498-4 505.
- [19] 刘 倩, 陶建敏, 张其林, 等. 葡萄雄性不育新种质 2004-6-12(魏可实生)花蕾发育的生化分析[J]. 江西农业学报, 2010, **22**(1): 54-56+60.
- LIU Q, TAO J M, ZHANG Q L, *et al.* Biochemical analysis of male newly-bred 2004-6-12 (WinK seeding) during flower development[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, **22**(1): 54-56+60.
- [20] 段 娜, 贾玉奎, 徐 军, 等. 植物内源激素研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, **31**(2): 159-165.
- DUAN N, JIA Y K, XU J, *et al.* Research progress on plant endogenous hormones[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, **31**(2): 159-165.
- [21] 李雪梅, 陈 强, 王兰兰, 等. 脱落酸对小麦幼苗光合及抗氧化酶的影响[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2006, (2): 221-223.
- LI X M, CHEN Q, WANG L L, *et al.* Effects of abscisic acid on photosynthesis and antioxidant enzymes of wheat seedlings [J]. *Journal of Shenyang Normal University* (Natural Science Edition), 2006, (2): 221-223.
- [22] 郑 焕, 任俊鹏, 贾 玥, 等. 葡萄雌能花新种质(‘2004-6-12’)花蕾发育过程中植物内源激素的变化[J]. 果树学报, 2012, **29**(3): 350-354.
- ZHENG H, REN J P, JIA Y, *et al.* Changes of phytohormone contents during anther abortion of male sterile new grapevine selection ‘2004-6-12’ [J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, **29**(3): 350-354.
- [23] 刘红艳, 吴 坤, 杨敏敏, 等. 芝麻显性细胞核雄性不育系内源激素、可溶性糖和淀粉含量变化[J]. 中国油料作物学报, 2014, **36**(2): 175-180.
- LIU H Y, WU K, YANG M M, *et al.* Variation of soluble sugar, starch and plant hormones contents in sesame dominant genic male sterile line during bud development[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2014, **36**(2): 175-180.
- [24] 王永琦, 杨小振, 莫言玲, 等. 西瓜雄性不育系‘Se18’抗氧化酶活性和内源激素含量变化分析[J]. 园艺学报, 2016, **43**(11): 2 161-2 172.
- WANG Y Q, YANG X Z, MO Y L, *et al.* Analysis on the changes of antioxidant enzyme activities and endogenous hormones contents in watermelon male sterile line Se18 during bud development [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, **43**(11): 2 161-2 172.
- [25] 刘海英, 冯必得, 茹振钢, 等. BNS 和 BNS366 小麦雄性不育与内源激素的关系[J]. 中国农业科学, 2021, **54**(1): 1-18.
- LIU H Y, FENG B D, RU Z G, *et al.* Relationships between phytohormones and male sterility of BNS and BNS366 in wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, **54**(1): 1-18.

[26] 马艳青, 邹学校. 蔬菜雄性不育研究与应用进展[J]. 作物研究, 2004,(S1): 414-420.
MA Y Q, ZOU X X. Research and application progress of vegetable male sterility[J]. *Crop Research*, 2004,(S1): 414-420.

[27] 李六林, 张绍铃. 植物生长物质对雄性育性的调控作用[J]. 中国农学通报, 2006,(5): 211-215.
LI L L, ZHANG S L. Regulative effects of plant growth substances on male fertility[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006,(5): 211-215.

[28] AMIT S, SAWHNEY V K. Metabolism of dihydrozeatin in floral buds of wild-type and a genic male sterile line of rape-seed (*Brassica napus* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1993,(9): 1 497-1 505.

[29] SHANNON S, LGMD De. Sex expression and the production of ethylene induced by auxin in the cucumber (*Cucumis sativum* L.) [J]. *Nature*, 1969, **223**(5 202): 186-186.

[30] 许小勇, 张 静, 孙希禄, 等. 大白菜 CMS7311 雄性不育的发生与花蕾内源激素含量变化的关系研究[J]. 华北农学报, 2014,(6): 177-182.
XU X Y, ZHANG J, SUN X L, *et al.* Relationship between male sterile occurrence and dynamics of endogenous hormone content during flower bud development in CMS7311 of heading Chinese cabbage[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2014,(6): 177-182.

[31] MCCONN M, BROWSE J. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant [J]. *The Plant Cell*, 1996, **8**(3): 403-416.

[32] MALEK B V, GRAAFF E, SCHNEITZ K, *et al.* The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway[J]. *Planta*, 2002, **216**(1): 187-192.

[33] 向 群, 张立平, 赵昌平, 等. 外源茉莉酮酸甲酯通过调节相关基因表达诱导光温敏雄性不育小麦 BS366 离体花药开裂[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, **26**(11): 1 028-1 035.
XIANG Q, ZHANG L P, ZHAO C P, *et al.* Methyl jasmonic acid in vitro induces anther dehiscence of photothermo-sensitive male sterile wheat line BS366 through regulating related gene expression[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, **26**(11): 1 028-1 035.

[34] DELKER C, STENZEL I, HAUSE B, *et al.* Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* enzymes, products, regulation[J]. *Plant Biology*, 2006, **8**(3): 297-306.

[35] 郭 航, 王志敏, 汤青林, 等. 茉莉酸调控花药开裂的研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, **31**(2): 10-17.
GUO H, WANG Z M, TANG Q L, *et al.* Progress on regulation of anther dehiscence by jasmonic acid [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, **31**(2): 10-17.

[36] 郭艳玲, 刘招龙, 张绍铃. 新高及爱宕梨雄性不育特性及其败育的细胞学研究[J]. 果树学报, 2007,(4): 433-437.
GUO Y L, LIU Z L, ZHANG S L. Cytological study on the microspore abortion in pear cultivar Niitaka and Atago[J]. *Journal of Fruit Science*, 2007,(4): 433-437.

[37] 刘 倩, 周蓓蓓, 张其林, 等. 葡萄雄性不育种质特性及其花粉败育的细胞学研究[J]. 果树学报, 2010, **27**(4): 514-520.
LIU Q, ZHOU B B, ZHANG Q L, *et al.* Cytological study of male sterile and pollenabortion in two types of grapes[J]. *Journal of Fruit Science*, 2010, **27**(4): 514-520.

[38] 洪 骏. 一个水稻雄性不育突变体的细胞学研究及不育基因定位[D]. 南京:南京农业大学, 2014.

[39] 彭 婧, 巩振辉, 黄 炜, 等. 辣椒雄性不育材料 H9A 小孢子败育机理[J]. 植物学报, 2010, **45**(1): 44-51.
PENG J, GONG Z H, HUANG Y, *et al.* Mechanism of microspores abortion on male sterile materials H9A and H9B in pepper(*Capsicum annuum*) [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2010, **45**(1): 44-51.

[40] 蒋会兵, 杨盛美, 刘玉飞, 等. 厚轴茶雄性不育株花药败育的生物学特性和细胞学研究[J]. 作物学报, 2020, **46**(7): 1 076-1 086.
JIANG H B, YANG S M, LIU Y F, *et al.* Biological characteristics and cytological studies on anther abortion of male sterile *Camellia crassocolumna* [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, **46**(7): 1 076-1 086.

(编辑:裴阿卫)