

# 辣椒胞质雄性不育与花蕾内源激素含量的关系

吴智明<sup>1,2</sup>, 胡开林<sup>2</sup>, 符积钦<sup>2</sup>, 乔爱民<sup>1</sup>

(1 仲恺农业工程学院 农业与园林学院, 广东 广州 510225; 2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**以辣椒 *Capsicum annuum* 胞质雄性不育系‘北A’及其保持系‘北B’、恢复系‘B162’和杂种F<sub>1</sub>为材料,采用间接酶联免疫(ELISA)检测技术测定分析了各材料不同发育时期花蕾中内源 IAA、ABA、ZR<sub>5</sub> 和 GA<sub>3</sub> 的含量和比值变化. 结果表明,不育系‘北A’花蕾中 IAA 和 ABA 的含量在各个时期均显著高于相应的保持系和恢复系,而 ZR<sub>5</sub> 的含量则显著低于可育材料;GA<sub>3</sub> 的含量在造孢细胞期至四分小孢子期呈缓慢降低的趋势,并且在四分小孢子期显著低于可育材料. 不育系花蕾中 IAA/ZR<sub>5</sub>、ABA/ZR<sub>5</sub> 以及 IAA/GA<sub>3</sub> 的比值均高于相应的保持系和恢复系. 初步认为花蕾中较高的 IAA 和 ABA 含量及较低的 ZR<sub>5</sub> 和 GA<sub>3</sub> 含量可能与辣椒胞质雄性不育有关.

**关键词:**辣椒; 胞质雄性不育; 内源激素

中图分类号: S641.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)02-0001-04

## Relationships Between Cytoplasmic Male Sterility and Endogenous Hormone Content of Pepper Bud

WU Zhi-ming<sup>1,2</sup>, HU Kai-lin<sup>2</sup>, FU Ji-qin<sup>2</sup>, QIAO Ai-min<sup>1</sup>

(1 College of Agriculture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Content of endogenous IAA, ABA, ZR<sub>5</sub> and GA<sub>3</sub> in flower buds of *Capsicum annuum*, pepper CMS line ‘Bei-A’ and maintainer line ‘Bei-B’, restorer line ‘B162’ and hybrid F<sub>1</sub> during five development stages were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that IAA and ABA contents of the sterile buds were higher, while ZR<sub>5</sub> content was lower than that of maintainer and restorer. GA<sub>3</sub> content in buds of ‘Bei-A’ decreased slowly from the stage of sporogenous cell to tetrad and was lower than that of fertile buds during the tetrad stage. The ratio of IAA/ZR<sub>5</sub>, ABA/ZR<sub>5</sub> and IAA/GA<sub>3</sub> in sterility line were remarkably higher than that of maintainer and restorer line. It was speculated that the higher content of IAA and ABA and lower ZR<sub>5</sub> and GA<sub>3</sub> of flower buds could have some relationships to pepper cytoplasmic male sterility.

**Key words:** *Capsicum annuum*; cytoplasmic male sterility; endogenous hormones

胞质雄性不育 (Cytoplasmic male sterility, CMS) 在高等植物中广泛存在. 利用 CMS 生产 F<sub>1</sub> 代杂种, 对于提高种子纯度、节约劳动力, 降低制种成本具有重要意义. 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, 其中在植物雄性不育与内源激素含量的关系研究方面, Sawhney 等<sup>[1]</sup> 认为导致植物雄性不育产生的原因很有可能是由于改变了植物体内源激素的平衡. 许多研究者对水稻<sup>[2]</sup>、小麦<sup>[3]</sup>、玉米<sup>[4]</sup> 和油菜<sup>[5]</sup> 等作物研究的结果表明, 雄性不育的发生与内源激

收稿日期: 2009-01-07

作者简介: 吴智明 (1981—), 男, 博士研究生; 通信作者: 胡开林 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: hukailin@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30370978)

素的变化有着密切的联系. 辣椒 *Capsicum annuum* L. 是我国最重要的蔬菜作物之一, 国内外对于辣椒 CMS 与内源激素的关系研究仅有少量报道<sup>[6-8]</sup>, 且存在较大的分歧. 本试验以辣椒细胞质雄性不育系及其相应的保持系、恢复系以及杂种  $F_1$  为材料, 通过对不同发育时期花蕾的内源 IAA、ABA、ZR<sub>5</sub> 和 GA<sub>3</sub> 的含量及相互比值进行动态变化分析, 以期揭示辣椒 CMS 与内源激素的关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

辣椒细胞质雄性不育系‘北 A’ (A) 及其相应的保持系‘北 B’ (B)、恢复系‘B162’ (R) 和杂种  $F_1$  种子由华南农业大学园艺学院蔬菜学系提供. 育苗后于 2005 年秋种植于华南农业大学蔬菜试验基地, 按常规管理. 盛花期, 从每一品系材料中随机选取 30 株生长势相近的植株取花蕾. 参考耿三省等<sup>[9]</sup>的方法, 根据花蕾大小, 将花药划分为造孢细胞期 (I)、小孢子母细胞期 (II)、四分小孢子期 (III)、单核小孢子期 (IV) 和花粉粒成熟期 (V) 5 个发育时期. 分别取各发育时期的花蕾, 准确称取 1.0 g 后液氮速冻, 保存于 -80 °C 冰箱中备用.

### 1.2 方法

**1.2.1 样品中激素的提取** 取冷冻保存的花蕾 1.0 g, 加 2 mL  $\varphi = 80\%$  的甲醇 (含  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  二叔丁基对甲苯酚), 在冰浴下研磨成匀浆, 转入 10 mL 试管, 再用 2 mL 提取液分次将研钵冲洗干净, 一并转入试管中, 摇匀后放置在 4 °C 冰箱中静置提取 4 h, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液; 沉淀中加 2 mL 提取液, 搅匀, 置 4 °C 下再提取 1 h, 离心, 合并上清液并记录体积, 弃残渣; 上清液过 C<sub>18</sub> 固相萃取柱. 具体步骤是:  $\varphi = 80\%$  甲醇 (1 mL) 平衡柱 → 上样 → 收集样品 → 移开样品后用  $\varphi = 100\%$  甲醇 (5 mL) 洗柱 →  $\varphi = 100\%$  乙醚 (5 mL) 洗柱 →  $\varphi = 100\%$  甲醇 (5 mL) 洗柱 → 循环; 将过柱后的样品转入 10 mL 离心管中, 用氮气吹干, 除去提取液中的甲醇, 用样品稀释液定容至 500  $\mu\text{L}$ .

**1.2.2 激素的测定** 样品中内源 IAA、ABA、ZR<sub>5</sub> 和 GA<sub>3</sub> 含量的测定采用间接酶联免疫法 (Enzyme-linked immunosorbent assays, 简称 ELISA)<sup>[10]</sup>, 试剂盒购自中国农业大学作物化学控制研究中心. 酶标仪型号为 Model 680 (Bio-Rad 公司). 每个样品重复测定 3 次, 取平均值进行统计分析.

试验采用标样的  $D_{490 \text{ nm}}$  与浓度的自然对数作线

性方程. 样品中的激素质量分数 [ $w / (\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$ ] 用下式计算:  $w = N \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot B / (V_1 \cdot m)$ . 式中,  $V_1$  表示进行真空浓缩干燥的上清液体积;  $V_2$  表示提取样品后上清液的总体积;  $V_3$  表示真空浓缩后用样品稀释液定容的体积;  $m$  表示样品的鲜质量;  $N$  表示样品中激素的质量浓度 ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ );  $B$  表示样品稀释液定容以后的稀释倍数.

## 2 结果与分析

### 2.1 内源 IAA 含量的动态变化

由图 1 可知, 不育系花蕾中 IAA 的含量除花粉粒成熟期外均显著高于相应的保持系和恢复系 ( $P = 0.05$ ); 保持系与恢复系花蕾中的 IAA 含量始终维持在较低的水平, 各发育时期差异不显著. 而杂种  $F_1$  花蕾中 IAA 的含量一直呈上升趋势, 到花粉粒成熟期达到最大值.

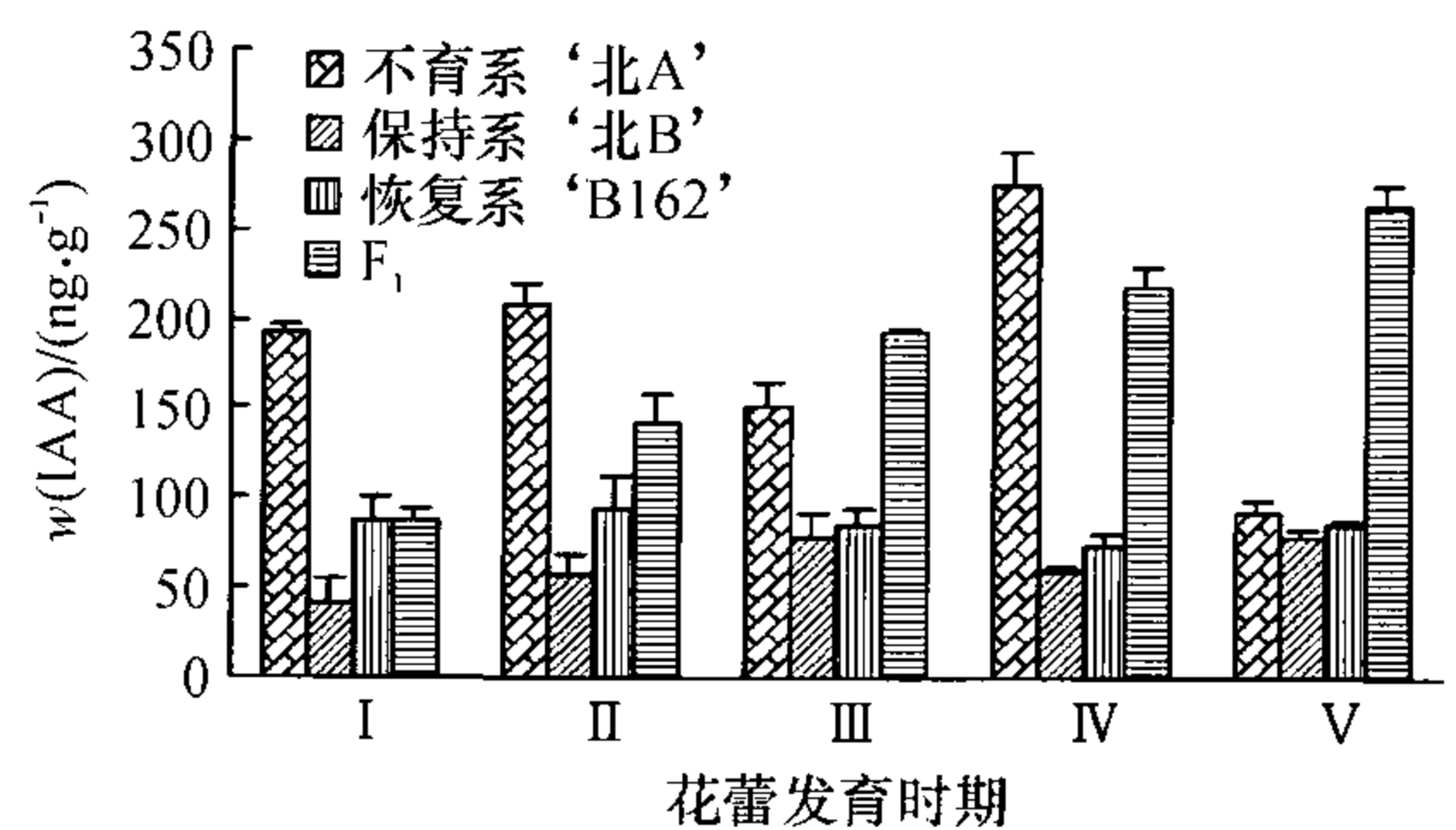


图 1 辣椒细胞质雄性不育系、保持系、恢复系和杂种  $F_1$  花蕾中 IAA 含量的变化

Fig. 1 Changes of IAA content of CMS line, maintainer, restorer and  $F_1$  of pepper buds

### 2.2 内源 ABA 含量的动态变化

图 2 的结果表明, 在整个花蕾发育过程中, 不育系花蕾中 ABA 的含量均高于其他可育材料. 其中在造孢细胞期、四分小孢子期、单核小孢子期和花粉粒

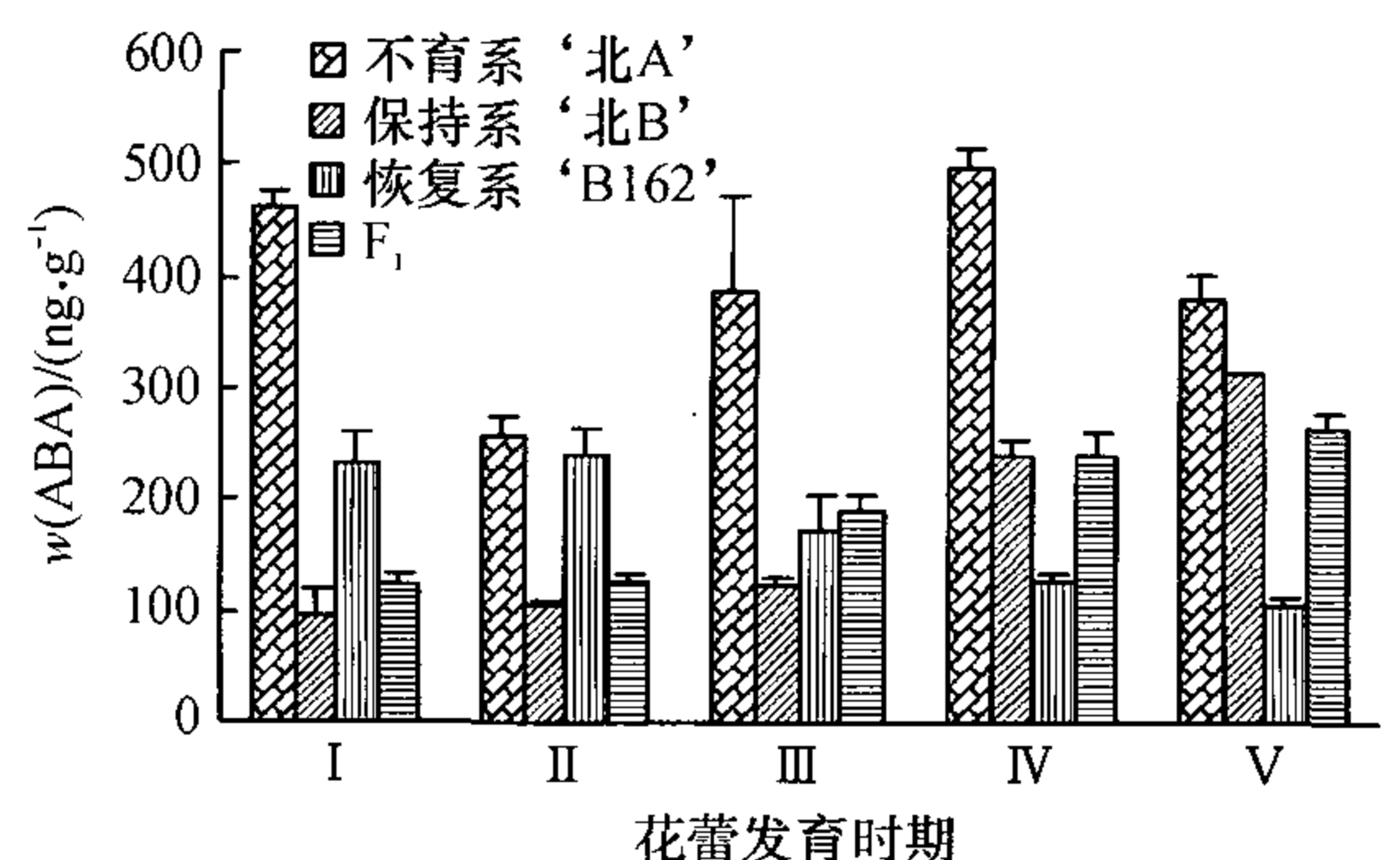


图 2 辣椒细胞质雄性不育系、保持系、恢复系和杂种  $F_1$  花蕾中 ABA 含量的变化

Fig. 2 Changes of ABA content of CMS line, maintainer, restorer and  $F_1$  of pepper buds

成熟期,不育系花蕾中 ABA 的含量显著高于其他 3 个可育材料 ( $P = 0.05$ ); 在小孢子母细胞期,不育系花蕾中 ABA 的含量显著高于保持系和杂种  $F_1$ , 但与恢复系差异不显著. 保持系和杂种  $F_1$  花蕾中 ABA 的含量呈缓慢增长的趋势, 且 2 个材料花蕾中的 ABA 含量在相同时期没有显著差异. 恢复系花蕾中 ABA 的含量随着花蕾的发育而缓慢降低.

### 2.3 内源 ZR<sub>5</sub> 含量的动态变化

在各个发育时期,不育系花蕾中 ZR<sub>5</sub> 的含量均较可育材料低. 保持系花蕾中 ZR<sub>5</sub> 的含量除造孢细胞期较低以外,在其余 4 个发育时期没有显著差异 ( $P = 0.05$ ). 恢复系花蕾中 ZR<sub>5</sub> 的含量则以造孢细胞期最高,且显著高于不育系、保持系和杂种  $F_1$ , 分别达到不育系、保持系和杂种  $F_1$  花蕾中含量的 5.0、3.2 和 2.7 倍,此后显著降低. 杂种  $F_1$  花蕾中 ZR<sub>5</sub> 的含量变化与 IAA 相类似,从造孢细胞期到花粉粒成熟期呈上升趋势,在花粉粒成熟期达到最大值(图 3).

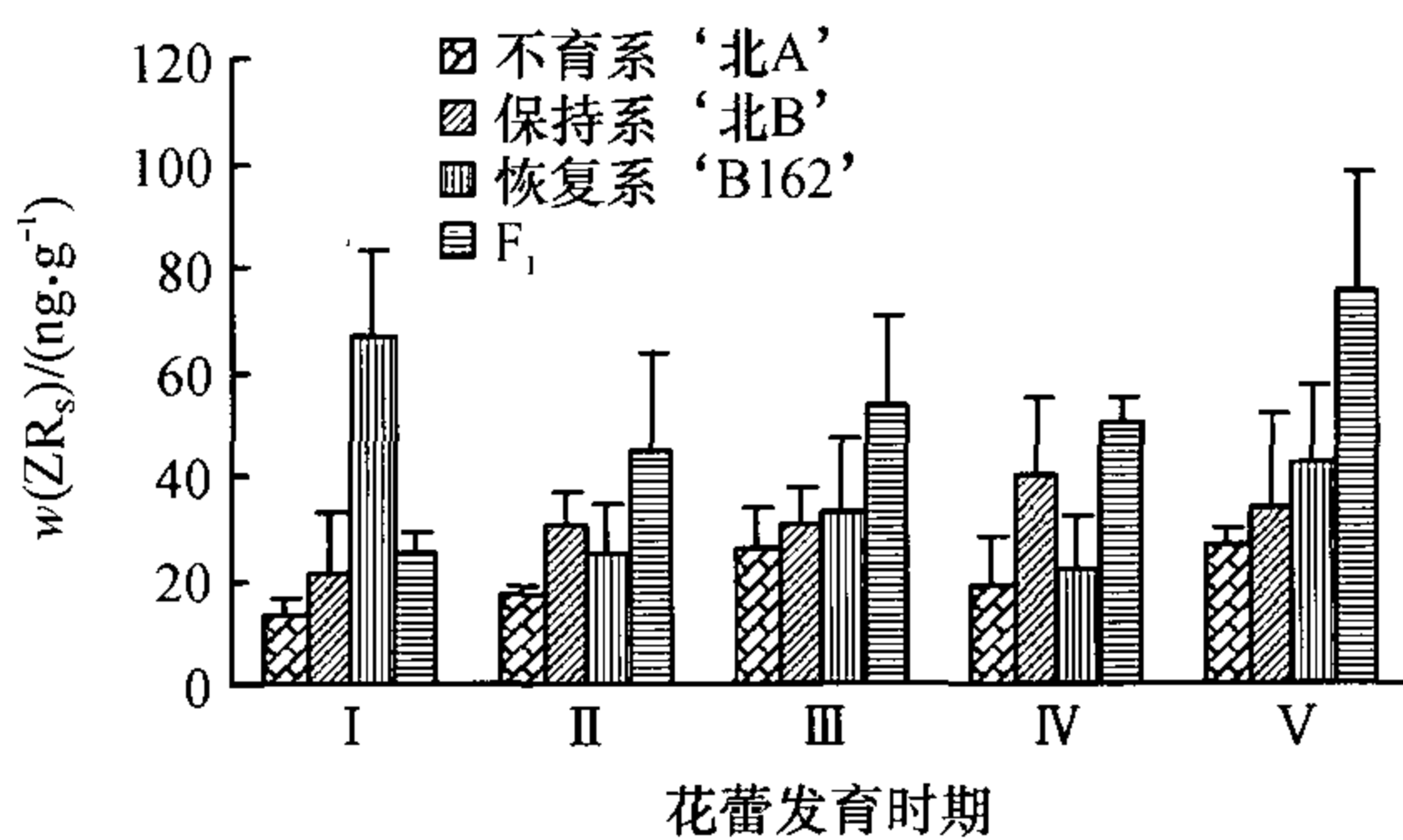


图 3 辣椒胞质雄性不育系、保持系、恢复系和杂种  $F_1$  花蕾中 ZR<sub>5</sub> 含量的变化

Fig. 3 Changes of ZR<sub>5</sub> content of CMS line, maintainer, restorer and  $F_1$  of pepper buds

### 2.4 内源 GA<sub>3</sub> 含量的动态变化

从图 4 可以看出,不育系花蕾中 GA<sub>3</sub> 的含量在造孢细胞期至四分小孢子期呈缓慢降低的趋势,在四分小孢子期达到次低点,而且低于其他可育材料花蕾中的含量,四分小孢子期以后呈现先增加后降低的变化. 保持系花蕾中 GA<sub>3</sub> 含量的变化与不育系正好相反,即在造孢细胞期至四分小孢子期呈明显增加的趋势,在四分小孢子期达到最高点,四分小孢子期以后呈现先降低后增加的变化. 恢复系和杂种  $F_1$  花蕾中 GA<sub>3</sub> 的含量在造孢细胞期至四分小孢子期呈先下降后上升的趋势,在四分小孢子期达到次高点,此后,恢复系花蕾中 GA<sub>3</sub> 的含量逐步降低,而杂种  $F_1$  花蕾中 GA<sub>3</sub> 的含量则出现先继续增加后降低的变化.

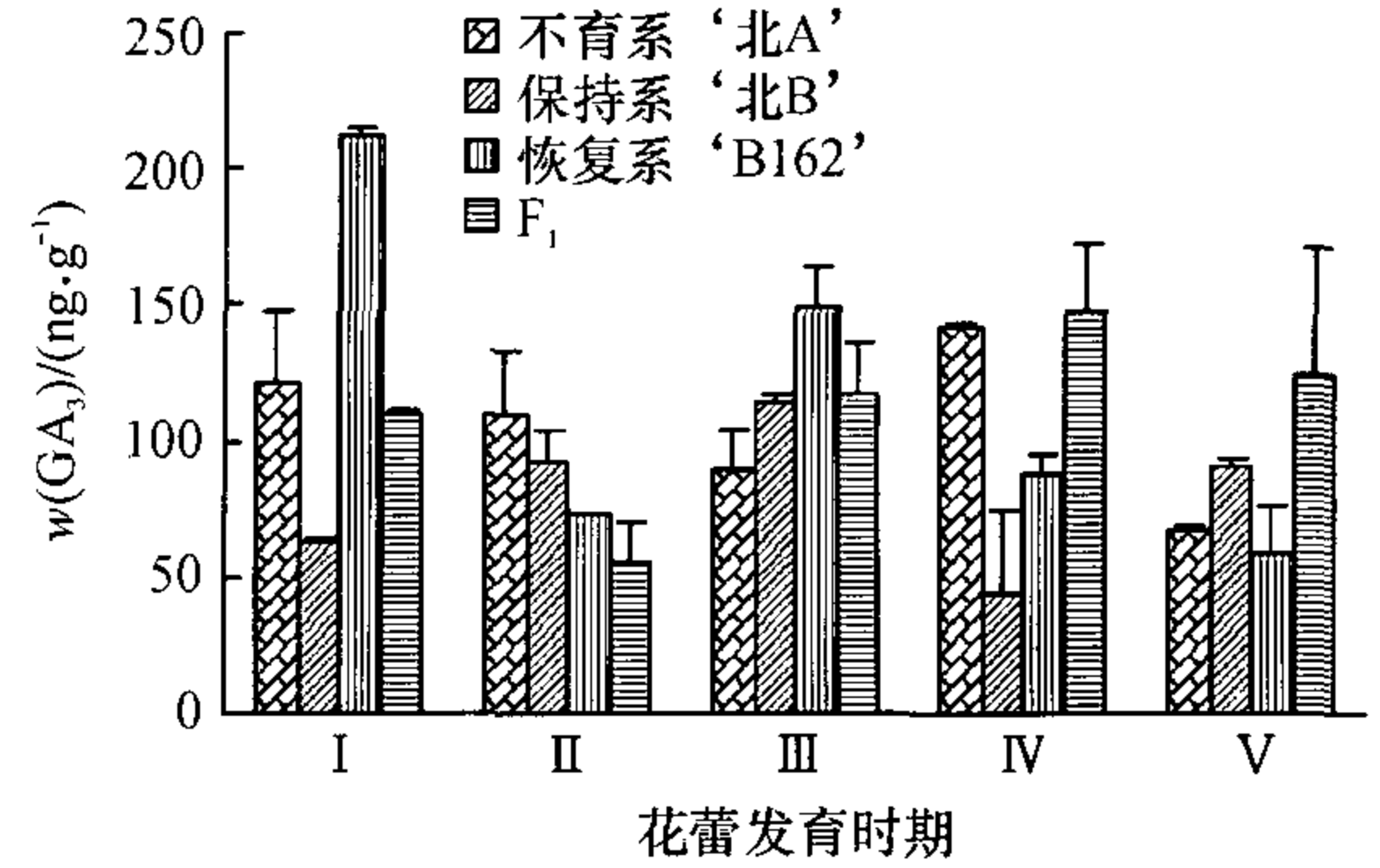


图 4 辣椒胞质雄性不育系、保持系、恢复系和杂种  $F_1$  花蕾中 GA<sub>3</sub> 含量的变化

Fig. 4 Changes of GA<sub>3</sub> content of CMS line, maintainer, restorer and  $F_1$  of pepper buds

### 2.5 激素间的相互关系

植物体中不同种类植物激素的生理效应有着相互促进或拮抗的效果,植物生长发育的调节往往是多种激素综合作用的结果. 为此,对本试验中所测的 4 种内源激素含量之间的比值进行了分析,结果(图 5)表明,不育系花蕾中 IAA/ZR<sub>5</sub> 以及 ABA/ZR<sub>5</sub> 的比值均较其他可育材料高, IAA/GA<sub>3</sub> 也高于相应的保持系和恢复系; ABA / IAA 在  $F_1$  中最低, 而不育系与保持系、恢复系差异不明显. 说明辣椒胞质雄性不育的发生可能也与激素间相对含量的改变与动态平衡有关.

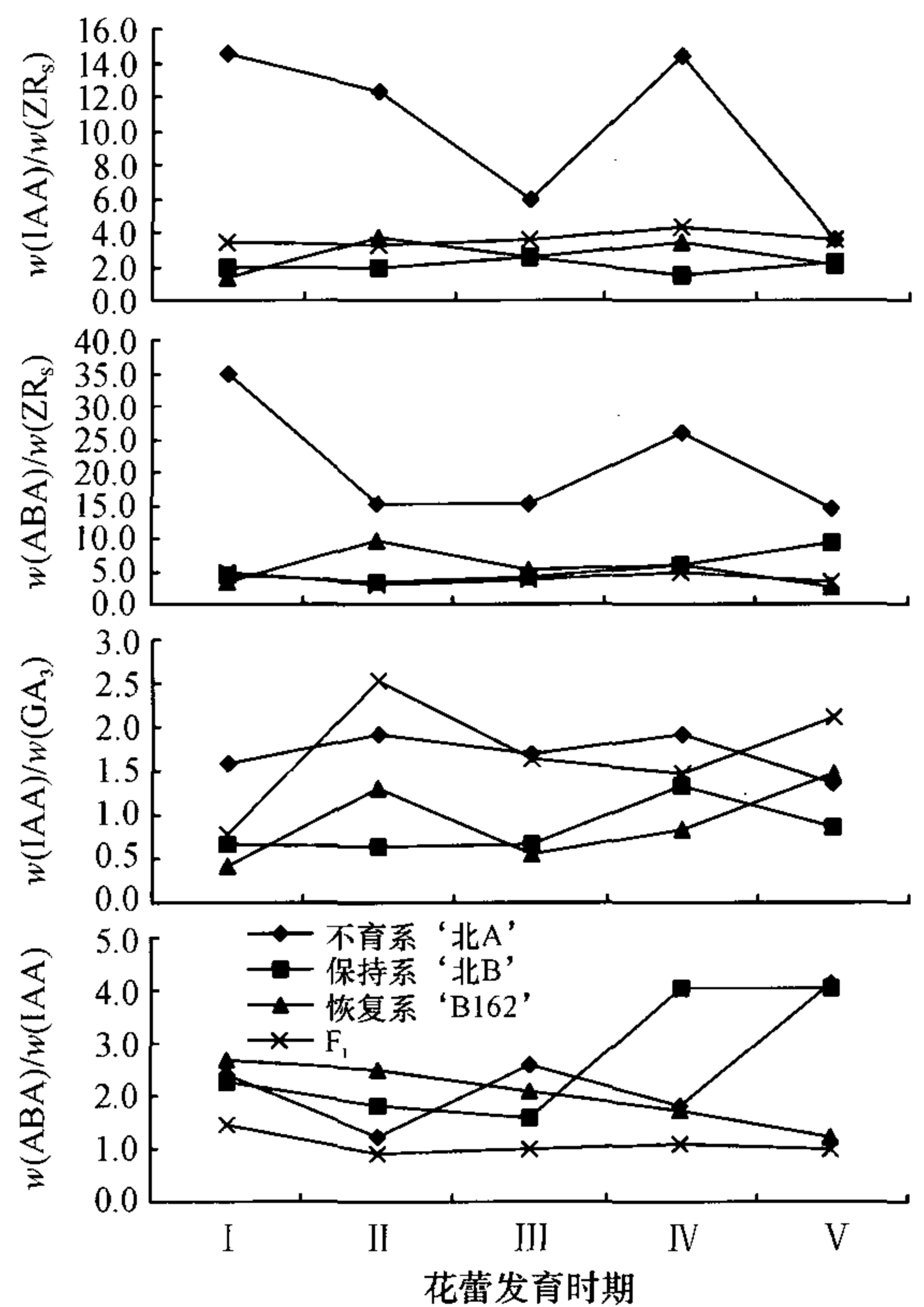


图 5 辣椒胞质雄性不育系、保持系、恢复系和杂种  $F_1$  花蕾中激素比值的变化

Fig. 5 Changes of the ratio of endogenous hormone of CMS line, maintainer, restorer and  $F_1$  of pepper buds

### 3 讨论

关于内源激素与植物雄性不育关系的研究已有大量报道,但研究的结果大多存在一些分歧. Sawhney 等<sup>[1]</sup>在总结前人研究结果后指出,IAA 含量的增加,乙烯的过度产生,ABA 水平的提高,以及 GA<sub>3</sub> 和 ZR<sub>5</sub> 含量的降低,均将导致植物雄性不育. Singh 等<sup>[11]</sup>对番茄以及田长恩等<sup>[5]</sup>对油菜的研究结果与此结论完全相符合.但也有不同研究结果的报道,例如黄厚哲等<sup>[12]</sup>对水稻雄性不育系进行研究的结果表明,花药中 IAA 的含量随着可育度的下降而下降,提出雄性不育的发生在于不育花药中的 IAA 库受到破坏而使花粉败育的观点.本研究的结果表明,不育系花蕾中 IAA 的含量从造孢细胞期到花粉粒成熟期整个花蕾发育过程中均显著高于相应时期保持系和恢复系花蕾中的含量,不育系花蕾中 ABA 的含量在整个花蕾发育过程中也均高于其他可育材料,而不育系花蕾中细胞分裂素 ZR<sub>5</sub> 的含量则低于其他可育材料,不育系花蕾中 GA<sub>3</sub> 的含量在四分小孢子期也比其他可育材料花蕾中的含量低,与 Sawhney 等<sup>[1]</sup>的观点是基本一致的.存在于植物体内的内源激素是微量的,而且受外界自然条件的变化影响很大,这可能也是现阶段进行激素水平测定出现试验结果分歧的一个重要原因.

关于内源激素是如何作用于植物产生雄性不育的,一直是备受关注的研究重点. Shannon 等<sup>[13]</sup>通过对黄瓜性别表达研究后指出,高浓度 IAA 可诱导乙烯过量产生,进而促进雌性表达或诱导雄性不育. Sawhney 等<sup>[1]</sup>认为激素含量的升高或者降低改变了植物体内源激素的平衡,从而直接诱发大多数植物产生雄性不育.解海岩等<sup>[14]</sup>认为可能存在内源激素调控育性基因表达的间接调控机理.倪德祥等<sup>[15]</sup>认为,激素必须与靶细胞中受体结合,转变成胞内信号,才能启动相应的生化反应,调节特定的基因表达.不难理解,在此过程中发生的异常都有可能致植物雄性不育.笔者同样认为,植物表型性状的改变最终起作用的是基因的表达与否,即是否有新的 mRNA 或蛋白质的合成.因此,我们正在结合基因及其表达开展进一步的深入研究.

此外,前人在研究植物内源激素与雄性不育的关系时,大多利用不育系和保持系作为研究材料,本研究增加了恢复系以及杂种 F<sub>1</sub> 作为试材,出现了杂

种 F<sub>1</sub> 花蕾中内源激素 IAA 和 ZR<sub>5</sub> 含量与保持系和恢复系花蕾中的含量有所不同的结果,其原因有待进一步研究.

#### 参考文献:

- [1] SAWHNEY V K, SHUKLA A. Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved? [J]. *Amer J Bot*, 1994, 81(12): 1640-1647.
- [2] 田长恩, 梁承邨, 黄毓文, 等. 乙烯与水稻细胞质雄性不育的关系[J]. *作物学报*, 1999, 25(1): 116-119.
- [3] 李英贤, 张爱民, 黄铁城. 小麦细胞质雄性不育与花药组织内源激素含量的关系[J]. *农业生物技术学报*, 1996, 4(4): 307-313.
- [4] 夏涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育性与乙烯的关系[J]. *华北农学报*, 1996, 11(3): 68-72.
- [5] 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.
- [6] 高夕全, 张子学, 夏凯, 等. 雄性不育辣椒中几种内源植物激素的含量变化[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37(1): 31-32.
- [7] 邹学校, 侯喜林, 刘荣云, 等. 辣椒细胞质雄性不育基因对不育系及杂交一代农艺性状和生化特性的影响[J]. *园艺学报*, 2004, 31(6): 732-736.
- [8] 沈火林, 安岩, 乔志霞. 胞质雄性不育和核雄性不育辣椒内源激素含量的变化[J]. *华北农学报*, 2006, 21(1): 68-71.
- [9] 耿三省, 王志源, 蒋健箴, 等. 辣椒雄性不育系小孢子发生的细胞学观察[J]. *园艺学报*, 1994, 21(2): 165-169.
- [10] 吴颂如, 陈婉芬, 周燮. 酶联免疫法(ELISA)测定内源植物激素[J]. *植物生理学通讯*, 1988(5): 53-57.
- [11] SINGH S, SAWHNEY V K. Cytokinins and abscisic acid in roots of the stamenless-2 mutant of tomato[J]. *Reports of the Tomato Genetics Cooperative*, 1992, 42: 34-35.
- [12] 黄厚哲, 楼仕林, 王侯聪, 等. 植物生长素亏缺与雄性不育的发生[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 1984, 23(1): 82-97.
- [13] SHANNON S, GUARDIA M D. Sex expression and the production of ethylene induced by auxin in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Nature*, 1969, 223: 186-188.
- [14] 解海岩, 蒋培东, 王晓玲, 等. 棉花细胞质雄性不育花药败育过程中内源激素的变化[J]. *作物学报*, 2006, 32(7): 1094-1096.
- [15] 倪德祥, 邓志龙. 植物激素对基因表达的调控[J]. *植物生理学通讯*, 1992, 28(6): 461-466.

【责任编辑 周志红】