

# 烟草花蕾中内源激素含量与雄性不育性的关系初探

刘齐元<sup>1</sup>, 刘飞虎<sup>2</sup>, 何宽信<sup>3</sup>, 朱肖文<sup>1</sup>, 李立新<sup>3</sup>

(1 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2 云南大学 生命科学院, 云南 昆明 650091;

3 江西省烟叶科学研究所, 江西 南昌 330045)

**摘要:**采用高效液相色谱法测定了烟草细胞质雄性不育系及其相应保持系花蕾发育过程中 IAA, GA<sub>3</sub>, ZT 及 ABA 4 种内源激素含量的动态变化。结果表明, 从小花蕾→中花蕾→大花蕾, 烟草雄性不育系花蕾中 IAA 和 ZT 含量都比相应保持系的高; 而不育系花蕾中 GA<sub>3</sub> 和 ABA 含量都比保持系的低。据此认为烟草花蕾内源激素含量的变化与雄性不育的发生有密切关系。

**关键词:**烟草; 细胞质雄性不育; 花蕾发育; 内源激素

中图分类号: S572.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)05-0079-04

## Preliminary Study on the Relationship Between Cytoplasmic Male Sterility and the Contents of Flower Bud Endogenous Hormone in Tobacco

LIU Qi-yuan<sup>1</sup>, LIU Fei-hu<sup>2</sup>, HE Kuan-xin<sup>3</sup>, ZHU Xiao-wen<sup>1</sup>, LI Li-xin<sup>3</sup>

(1. Agronomy College, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Life Science College, Yunnan University, Kunming 650091, China;

3. Institute of Tobacco Science, Jiangxi Province, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The dynamic changes of the indole acetic acid (IAA), gibberellin (GA<sub>3</sub>), zeatin (ZT) and abscisic acid (ABA) contents in flower buds of tobacco cytoplasmic male sterility (CMS) and homolog maintainer lines were determined by high performance liquid chromatogram. The results showed that from small bud → middle bud → big bud, the content of IAA and ZT in CMS buds were higher than in maintainer line buds. While the content of GA<sub>3</sub> and ABA in CMS buds were lower than in maintainer line buds. It was suggested that the changes of endogenous hormone contents were closely related with the occurrence of cytoplasmic male sterility.

**Key words:** Tobacco; Cytoplasmic male sterility; Development of flower bud; Endogenous hormone

植物内源激素包括生长素类、赤霉素类、细胞分裂素类、脱落酸和乙烯等多种, 它们是植物代谢反应的产物, 普遍存在于植物组织内, 并参与植物生长发育中的几乎所有生理过程的调节。植物激素对雄性不育性的发生也起着重要的调节作用, 国内外在不同育性植物内源激素水平的变化、植物激素对雄蕊和花粉发育的影响以及雄性不育的诱导与恢复等方面开展了大量的研究, 但研究结果并不一致, 有些结果在不同植物、不同雄性不育类型中甚至相反。

本研究对烟草雄性不育系及其保持系不同大小

的花蕾内源激素吲哚乙酸 (Indole acetic acid, IAA)、赤霉素 (Gibberellin, GA<sub>3</sub>)、脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 和玉米素 (Zeatin, ZT) 含量进行测定, 并探讨它们与烟草雄性不育性的可能关系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料取样

供试材料为 3 对烟草雄性不育系及其保持系, 即 MS 革新 3 号和革新 3 号、MS31 和 31、MS 云烟 85 和云烟 85。

收稿日期: 2006-06-12

基金项目: 云南省农业生物技术重点实验室开放项目基金 (2003E01); 江西省烟叶科学研究所资助项目

作者简介: 刘齐元 (1962-), 男, 山西高安人, 博士, 副教授, 从事植物遗传育种与作物栽培教学与科研工作。

于盛花期取上述材料不同大小的花蕾,立即带回室内,在弱光下按可育雄蕊花药发育时期对应的花蕾分小蕾、中蕾和大蕾 3 组,每组重复取样 5 个。小花蕾长度在 3 mm 以下,中花蕾长度在 3~5 mm,大花蕾长度在 5~7 mm,镜检小中大花蕾保持系花药及小孢子发育阶段分别为四分体时期、单核时期和二核期。投入液氮速冻后取出,放入-80℃冰箱保存。

## 1.2 方法

1.2.1 植物激素的提取、纯化 将新鲜样品除去水分,用棉纱布包好立即放入液氮中处理 2~3 min,然后将样品在遮光条件下进行真空冷冻干燥,待样品充分干燥后密封放入-60℃超低温冰箱中保存。

准确称取冻干样品 0.5 g 左右(精确到 0.1 mg),分 4 次加入预冷的 80% 甲醇 11 mL(5+2+2+2),在弱光下冰浴中研磨成匀浆,于 4℃冰箱中浸提过夜(15 h)。以 3 000×g 离心(4℃) 20 min,倒出上清液,残渣加入 2 mL 预冷的 80% 甲醇后旋涡振荡 5 min,再离心(3 000×g; 20 min),倒出上清液。残渣重复上述操作一次后丢弃,合并的上清液进行真空冷冻离心浓缩除去甲醇,加入 8 mL 醋酸铵(0.1 mol/L, pH 9.0)复溶,离心(27 000×g; 20 min),上清液经过聚乙烯吡咯烷酮(PVP)柱和二乙氨基乙基交联葡聚糖凝胶(DEAE sephadex A<sub>25</sub>)柱,以 C18 Sep\_pak 小柱(Classical, Waters 公司生产)分别收集细胞分裂素类激素和酸性激素,以 50% 甲醇(HPLC)洗脱后真空冷冻离心浓缩除去洗脱液。

## 1.2.2 植物激素的检测

1.2.2.1 植物激素检测使用器材 Agilent1100 高效液相色谱仪、G1314A 紫外检测器、Agilent Hypersil ODS 5 μm 分析柱(4.6 mm×250 mm)、甲醇(HPLC)、冰醋酸、Fluka 公司生产的 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA、ZT 4 种激素标样。

1.2.2.2 检测方法 生长素、赤霉素测定色谱条件:流动相为甲醇、水、1% 的醋酸溶液。起始为 30% 的甲醇、5% 的醋酸溶液,梯度洗脱,洗脱 13 min 后甲醇达到 43%。流速 1 mL/min,检测波长 208 nm。根据外标法定量;脱落酸、玉米素测定色谱条件:流动相为甲醇、水、0.4% 的乙酸溶液(pH 值为 3.5)。起始为 50% 的三乙胺溶液,50% 的水,6 min 后甲醇由 0 变为 30%,然后梯度洗脱 20 min 后甲醇达到 50%。流速 1 mL/min,检测波长 254 nm。根据外标法定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长素(吲哚乙酸, IAA)含量的变化

各不育系小、中、大花蕾 IAA 含量都比其相应保持系的高(图 1),尤其是 MS 革新 3 号和 MS 云烟 85 花蕾的 IAA 含量明显比其保持系的大,分别是其保持系的 134.82%~281.63%;而 MS31 花蕾的 IAA 含量仅大花蕾比其保持系的大得多(约为其保持系的 3 倍),而在小、中花蕾则与保持系的相差很小(是其保持系的 103.12%~108.66%)。还可以看出,革新 3 号、MS 革新 3 号和 31 花蕾中 IAA 含量都随花蕾的发育而快速下降;而云烟 85 和 MS 云烟 85 花蕾的 IAA 含量则随花蕾发育而略有升高;MS31 花蕾的 IAA 含量则是先降后升。

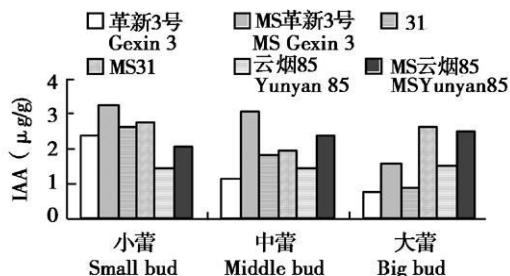


图 1 烟草雄性不育系与保持系花蕾生长素(IAA)含量

Fig 1 The IAA content of buds in tobacco male sterile lines and maintainer lines

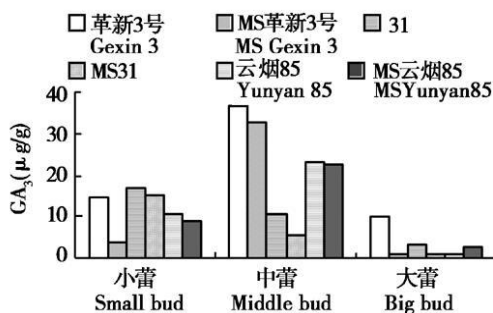


图 2 烟草雄性不育系与保持系花蕾赤霉素(GA<sub>3</sub>)含量

Fig 2 The GA<sub>3</sub> content of buds in tobacco male sterile lines and maintainer lines

### 2.2 赤霉素(GA<sub>3</sub>)含量的变化

图 2 为烟草各材料不同大小花蕾的赤霉素(GA<sub>3</sub>)含量,可以看出,所有不育系的小、中、大花蕾 GA<sub>3</sub> 含量都比其相应的保持系的低(仅 MS 云烟 85 的大花蕾例外)。特别是 MS 革新 3 号的大花蕾和小花蕾,其 GA<sub>3</sub> 含量仅为保持系的 13.09% 和 27.51%;而 MS31 的大花蕾和中花蕾,其 GA<sub>3</sub> 含量也只有相应保持系的 32.68% 和 49.82%。随着花蕾的发育,MS 革新 3 号和革新 3 号、MS 云烟 85 和云

烟 85 花蕾中的  $GA_3$  含量都是先急剧升高后又急剧下降, 而 MS31 和 31 花蕾中的  $GA_3$  含量则是由高到低一直急剧下降。到大花蕾阶段, 除革新 3 号外, 所有材料的  $GA_3$  含量都很低。

### 2.3 脱落酸 (ABA) 含量的变化

由图 3 可以看出, 所有不育系各时期花蕾的 ABA 含量都比相应保持系的低。尤其是 MS 革新 3 号的大花蕾及 MS 云烟 85 的小花蕾和大花蕾, 其 ABA 含量只有相应保持系的 8.37% ~ 11.04%; MS 革新 3 号中花蕾及 MS31 大花蕾的 ABA 含量也分别只有其保持系的 28.12% 和 35.89%。随着花蕾的生长发育, 各材料花蕾中 ABA 含量的变化趋势各不相同: MS 革新 3 号和革新 3 号花蕾中 ABA 含量快速下降; 云烟 85 花蕾中 ABA 含量则呈非常缓慢下降趋势; MS31 和 MS 云烟 85 花蕾中 ABA 含量表现为先升后降; 31 花蕾中 ABA 含量则一直上升。

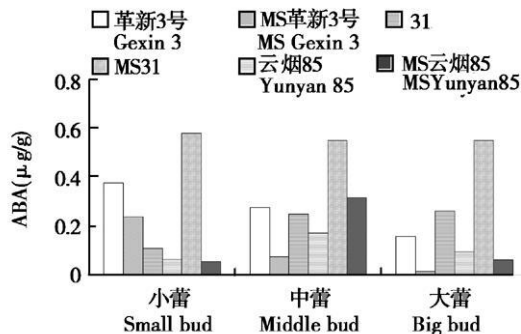


图 3 烟草雄性不育系与保持系花蕾 ABA 含量  
Fig 3 The ABA content of buds in tobacco male sterile lines and maintainer lines

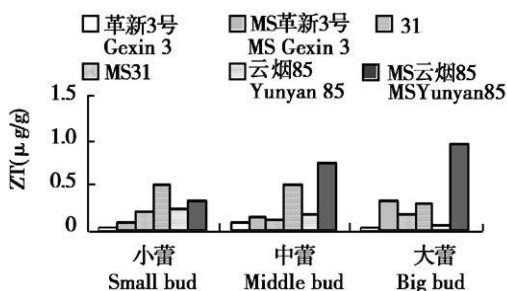


图 4 烟草雄性不育系与保持系花蕾玉米素 (ZT) 含量  
Fig 4 The ZT content of buds in tobacco male sterile lines and maintainer lines

### 2.4 玉米素 (ZT) 含量的变化

各材料不同大小花蕾的玉米素 (ZT) 含量如图 4 所示, 3 个不育系各时期花蕾的 ZT 含量都比相应保持系的高。尤其是 MS 革新 3 号和 MS 云烟 85 的大花蕾, 其 ZT 含量分别是相应保持系的 18.54 倍和 16.77 倍; MS31 和 MS 云烟 85 中花蕾的 ZT 含量也分别是其相应保持系的 4.12 倍和 3.82 倍; 其余不育

系花蕾中的 ZT 含量也比相应保持系高 48.71% ~ 146.42%。随着花蕾的生长发育, 各材料花蕾中 ZT 含量的变化趋势各不相同: MS 革新 3 号和 MS 云烟 85 花蕾中的 ZT 含量逐渐升高; MS31 和云烟 85 花蕾中的 ZT 含量则逐渐下降; 革新 3 号花蕾中的 ZT 含量是先升后降, 而 31 花蕾中的 ZT 含量是先降后升。

## 3 讨论

### 3.1 生长素 (IAA) 与雄性不育性

大量研究结果表明, 植物雄性不育的发生与生长素的亏缺有关<sup>[1~3]</sup>。但是, 也有不少结果与此相反, 如番茄雄性不育突变体 s12 雄蕊中生长素的含量高于相应可育系<sup>[4]</sup>; GMS 和 CMS 油菜的不育系雄蕊中生长素的含量也比相应可育系的高<sup>[5]</sup>及油菜胞质雄性不育系花蕾中的 IAA 含量比其保持系的高<sup>[6]</sup>。这些结果显示了生长素的积累也与雄性不育的发生相关联。转基因研究也表明, 农杆菌的 *RolB* 基因, 可以引起 IAA 含量剧增, 将其与金鱼草的绒毡层特异表达启动子组合成嵌合基因导入烟草, 可以大大提高花药内 IAA 水平, 降低赤霉素水平, 并引起花药发育阻滞以致花粉败育<sup>[7]</sup>。有研究认为, 高浓度的 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<sup>[8]</sup>。这可能是 IAA 含量高导致雄性不育的一个重要原因, 另一个原因可能与这些材料的败育方式都是无雄蕊或无花粉囊型有关。

本研究结果也发现, 烟草雄性不育系花蕾中 IAA 含量都比相应保持系的高, 且本研究所用的雄性不育材料也都是属于无雄蕊型或无花药型。可见, 无雄蕊型败育的植物材料花蕾中 IAA 含量较高是一个共同现象。

### 3.2 赤霉素 (GAs) 与雄性不育性

植物雄性不育系花器官中的 GAs 含量比其相应保持系的低<sup>[9, 10]</sup>。当然也有些结果表明雄性不育系花蕾的 GAs 含量比保持系的高<sup>[6]</sup>。

本研究结果表明, 烟草雄性不育系花蕾中  $GA_3$  含量比保持系的低, 这有可能是导致烟草雄性不育的原因之一。因为赤霉素 (包括  $GA_3$ ) 与多胺 (腐胺、亚精胺、精胺和尸胺) 有某种平行关系。赤霉素含量的下降, 可能会导致多胺水平的降低。多胺和乙烯都是由蛋氨酸经腺苷—蛋氨酸合成而来的, 抑制多胺的合成能促进乙烯的释放, 而乙烯是公认的杀雄剂, 由此可以推测 GAs 含量的下降可能是导致雄性不育的一个原因<sup>[11]</sup>。

### 3.3 脱落酸(ABA)与雄性不育性

脱落酸是植物体内最重要的生长抑制剂,能抑制核酸和蛋白质的生物合成。很多研究表明,植物雄性不育系花器官中的 ABA 含量比保持系的高<sup>[6,12]</sup>。但也有研究表明,植物雄性不育花器官中 ABA 含量比保持系的低,如榨菜胞质雄性不育系雄蕊中 ABA 含量很低,而保持系雄蕊发育成熟期 ABA 含量很高<sup>[13]</sup>。赵玉锦等认为内源 ABA 含量的剧减是农垦 58 S 雄性败育的原因之一<sup>[14]</sup>。

本研究结果也表明,烟草雄性不育系花蕾中 ABA 含量比其保持系的低得多,这可能与烟草雄性不育性的发生有关。因为,当植物体受到环境胁迫时,其体内的 ABA 会急剧上升,ABA 的积累与抗逆性的增强存在显著的正相关<sup>[15]</sup>。烟草雄性不育系不同发育时期花蕾中的 ABA 含量均比保持系的低,这说明不育系花蕾的抗逆性比保持系的弱。我们的研究表明,烟草雄性不育系在花蕾生长发育期间,活性氧的产生速率比其保持系的强,花蕾中活性氧积累偏多,导致细胞膜脂过氧化增强,积累较多的丙二醛,细胞膜受损伤较大,细胞内电解质外渗量增大,相对电导率增大。这些都可以理解为不育花蕾处于一种复杂的逆境中,而不育系花蕾的抗逆性又较弱,所有这些都很有可能影响雄性器官的发育,并最终导致雄性不育。

### 3.4 玉米素(ZT)与雄性不育性

不同作物种类雄性的育性与细胞分裂素含量的关系不一样,如番茄<sup>[4]</sup>、油菜<sup>[16]</sup>及榨菜<sup>[17]</sup>等作物雄性不育株中细胞分裂素含量都比可育株的低;而 CMS 玉米<sup>[3]</sup>、K、T 型 CMS 小麦<sup>[18]</sup>以及辣椒<sup>[19]</sup>的不育系花药组织或者花蕾与可育系相比,却表现为内源细胞分裂素类物质的积累。本研究结果也表明,烟草雄性不育系花蕾中的 ZT 含量比其保持系的高。

高浓度的细胞分裂素类物质能抑制组织和离体线粒体的抗氰呼吸和总呼吸,导致呼吸系统、能量代谢的紊乱以及物质合成的不足;并且细胞分裂素类物质在植物体内倾向于拮抗 IAA 对细胞伸长的作用<sup>[20]</sup>。因此,雄性不育植株花器官中 ZT 含量较高可能是造成植物雄性不育的一个原因,这从转 *ipt* 基因烟草使细胞分裂素水平上升而导致烟草雄性不育<sup>[21]</sup>也可以得到印证。

### 参考文献:

- [1] 何长征,萧浪涛,刘志敏,等.植物激素与雄性不育关系的研究进展[J].中国农学通报,2002,18(3):65-69.
- [2] 黄厚哲,楼士林,王侯聪,等.植物生长素亏损与雄性不育的发生[J].厦门大学学报(自然科学版),1984,23(1):82-97.
- [3] 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[J].作物学报,1994,20(1):26-32.
- [4] 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* Mill.) [J]. Plant, Cell and Environment, 1992, 15: 373-377.
- [5] Shukla A, Sawhney V K. Metabolism of dihydrozeatin in floral buds of wild type and a genic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. J Exp Bot, 1993, 44(266): 1497-1505.
- [6] 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.
- [7] Spena A, Estruch J J, Prinsen E, et al. Anther-specific expression of the rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes* increases IAA content in anthers and alters anther development and whole flower growth [J]. Theor Appl Genet, 1992, 84: 520-527.
- [8] Shannon S, de la 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.
- [9] Nakajima M, Yamaguchi I, Kizawa S. Semi-quantification of GA<sub>1</sub> and GA<sub>4</sub> in male sterile anthers of rice by radioimmunoassay [J]. Plant and Cell Physiology, 1991, 32: 522-513.
- [10] 黄少白,周燮.水稻细胞质雄性不育与内源 GA<sub>1</sub>+4 和 IAA 的关系 [J]. 华北农学报,1994,9(3):16-20.
- [11] 李英贤,张爱民.植物雄性不育激素调控的研究进展 [J]. 中国农学通报,1995,11(3):25-28.
- [12] Shukla A, Sawhney V K. Abscissic acid: one of the factors affecting male sterility in *Brassica napus* [J]. Physiologia Plantarum, 1994, 91: 522-528.
- [13] 张明方,陈竹君,汪炳良,等.榨菜胞质雄性不育系和保持系花器发育过程中内源激素变化 [J]. 浙江农业大学学报,1997,23(2):154-157.
- [14] 赵玉锦,董哲,陈华君,等.内源植物激素与光敏核不育水稻农垦 58S 育性的关系 [J]. 植物学报,1996,38(12):936-941.
- [15] 汪良驹,周燮.高等植物的脱落酸生物合成及其调节 [J]. 植物生理学通讯,1989,(2):7-12.
- [16] Singh S, Sawhney V K. Cytokinins in normal and the ogura (ogu) cytoplasmic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Plant Science, 1992, 86: 147-154.
- [17] 陈竹君,张明方,汪炳良,等.榨菜胞质雄性不育及其农艺性状的研究 [J]. 园艺学报,1995,22(1):40-46.
- [18] 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的关系 [J]. 农业生物技术学报,1996,4(4):307-313.
- [19] 高夕全,张子学,夏凯,等.雄性不育辣椒中几种内源激素的含量变化 [J]. 植物生理学通讯,2001,37(1):31-32.
- [20] 李英贤,张爱民,梁振兴.小麦雄性不育的发生与花药组织内激素平衡的关系 [J]. 农业生物技术学报,1998,6(1):71-75.
- [21] 耿飒,麻密,李国凤,等.*ipt* 基因定位表达对转基因烟草育性的影响 [J]. 植物学报,2000,42(2):217-220.