

# 辣椒细胞核雄性不育材料 GMS702AB 的鉴定

汪 胜<sup>1,2</sup>, 贾 利<sup>2</sup>, 唐 菁<sup>2,3</sup>, 李浩宇<sup>1,2</sup>, 宋婷婷<sup>2</sup>, 袁娟伟<sup>2,3</sup>, 严从生<sup>2</sup>, 方 凌<sup>2</sup>,  
张其安<sup>2</sup>, 孙玉军<sup>1</sup>, 江海坤<sup>2</sup>, 孙学良<sup>2</sup>, 张 涛<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>安徽科技学院农学院, 凤阳 233100; <sup>2</sup>安徽省农业科学院园艺研究所/园艺作物种质资源创制及高效栽培安徽省重点实验室/  
农业农村园艺作物种质资源创制与利用重点实验室(部省共建), 合肥 230031; <sup>3</sup>安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

**摘要:** 本研究发现1个具有雄性不育与单性结实特征的细胞核雄性不育系辣椒材料, 并对该材料的农艺性状、单性结实坐果率、不同发育时期的不育系单性结实与可育系单性结实内源激素进行测定; 利用田间鉴定和显微镜镜检, 分析了F<sub>2</sub>群体的遗传分离情况, 并利用辣椒细胞核雄性不育基因 *ms-3*, *msw*, *ms*, *msms*, *msc-1* 开发的分子标记, 分析了群体的育性分离比。结果表明: 不育系单性结实果实纵横径较大, 可育系与不育系单性结实坐果率明显不同, 可育系坐果率为22%, 不育系坐果率为43%; 不同时期不育系单性结实果实的赤霉素(GA4)含量显著高于可育系单性结实果实; 田间鉴定和分子标记检测表明, F<sub>2</sub>群体中可育系有97株, 不育系有30株, 分离比为3.23:1, 符合孟德尔遗传规律, 确定其育性由隐性单基因控制, 将该辣椒细胞核雄性不育系命名为GMS702AB。本研究提供新的辣椒不育系, 有助于辣椒育种和种子生产。

**关键词:** 辣椒; 雄性不育; 分子标记; 单性结实

## Identification of Nuclear Male Sterile Material GMS702AB in Pepper

WANG Sheng<sup>1,2</sup>, JIA Li<sup>2</sup>, TANG Jing<sup>2,3</sup>, LI Haoyu<sup>1,2</sup>, SONG Tingting<sup>2</sup>, YUAN Juanwei<sup>2,3</sup>, YAN Congsheng<sup>2</sup>,  
FANG Ling<sup>2</sup>, ZHANG Qian<sup>2</sup>, SUN Yujun<sup>1</sup>, JIANG Haikun<sup>2</sup>, SUN Xueliang<sup>2</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agriculture, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100; <sup>2</sup>Institute of Horticulture, Anhui Academy of Agricultural Sciences / Anhui Provincial Key Laboratory for Germplasm Resources Creation & High-Efficiency Cultivation of Horticultural Crops/Key Laboratory of Germplasm Creation and Utilization of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Co-construction by Ministry and Province), Hefei 230031; <sup>3</sup>College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** This study identified a nuclear male sterile pepper line showing male sterility and parthenocarpy characteristics, and the agronomic traits and parthenocarpy fruit setting rate of the material were determined, and the parthenocarpy of the sterile line at different developmental stages and the parthenocarpy of the fertile line were determined for endogenous hormones. In addition, the genetic segregation of F<sub>2</sub> population was analyzed by field identification and microscopic examination, and the fertility segregation ratio of the population was analyzed by using the molecular markers developed by pepper nuclear male sterile genes *ms-3*, *msw*, *ms*, *msms*

收稿日期: 2023-09-23 修回日期: 2023-12-13 网络出版日期: 2023-12-22

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230923001>

第一作者研究方向为园艺作物育种栽培, E-mail: 2091356882@qq.com

通信作者: 孙玉军, 研究方向为园艺作物逆境生理, E-mail: sunyujun208@163.com

江海坤, 研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: jhk211@163.com

**基金项目:** 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-23-G40, CARS-23-G49); 国家重点研发计划(2023YFD1201500); 安徽省农业科学院青年英才经费(QNYC-202121); 安徽省科技重大专项(202203a06020030); 安徽省蔬菜产业技术体系专项(皖农科函[2021]711号); 安徽省辣椒良种联合攻关项目

**Foundation projects:** China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-23-G40, CARS-23-G49); The National Key Research and Development Program (2023YFD1201500); The Second Level Youth Development Fund from Anhui Academy of Agricultural Sciences (QNYC-202121); Important Science & Technology Specific Projects of Anhui Province (202203a06020030); The Anhui Province Vegetable Industry Technology System (Anhui Agricultural Science Letter [2021] No.711); Anhui Province Improved Variety Joint Research Project

and *msc-1*. The results showed the vertical and horizontal diameters of the parthenocarpic fruit of the sterile line were larger, and the fruit setting rate of the fertile line and the sterile line was significantly different. The fruit setting rate of the fertile line was 22%, and the fruit setting rate of the sterile line was 43%. The GA4 (gibberellin) content in the parthenocarpic fruit of the sterile line in different periods was significantly higher than that of the fertile line. There are 97 fertile lines and 30 sterile lines in the F<sub>2</sub> population, with a separation ratio of 3.23 : 1, which is consistent with the Mendelian inheritance law. It shows that its fertility was controlled by a recessive single gene. We named the nuclear male sterile line of pepper as GMS702AB. This study provides a new nuclear male sterile line valuable in pepper breeding and seed production.

**Key words:** pepper; male sterile; molecular marker; parthenocarpic

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属于茄科(Solanaceae)辣椒属(*Capsicum*),原产于热带和亚热带地区,为一年生或有限多年生植物<sup>[1]</sup>。辣椒原分布于墨西哥及哥伦比亚地区,如今在全球各地广泛种植,是世界上仅次于番茄的第二大茄科蔬菜作物。在世界范围内,辣椒品种多样,其变种可作为香料作物种植<sup>[2]</sup>。近些年,中国辣椒产业发展迅速,年种植面积大约210万公顷,总产量达6400万吨以上,年播种面积已经位居所有蔬菜之首<sup>[3]</sup>。

雄性不育是指植物中雌蕊发育正常而雄性器官发生退化、发育不良或产生的花粉不能使其正常可育的现象<sup>[4]</sup>。辣椒是少数几种同时具有细胞核雄性不育系和细胞质雄性不育系的作物之一<sup>[5]</sup>。目前,这两种不育系都已被应用于辣椒的杂交种生产。辣椒是常异花授粉植物<sup>[6]</sup>,杂交品种优势非常明显,在田间杂交制种时,由于辣椒花的结构很小,人工去雄和授粉是一个耗时的过程,增加了杂交种的生产成本,且容易降低种子纯度。而利用不育系材料制种可以免去人工去雄等复杂步骤,有效提高种子纯度<sup>[7]</sup>。特别是近年来,水稻“第三代”杂交育种系统成功构建<sup>[8-9]</sup>,雄性不育基因的挖掘不仅对花粉发育生物学有意义,而且在辣椒、水稻、大豆等种质资源创制以及杂交种子生产中也变得越来越重要<sup>[10-11]</sup>。例如在水稻中,张维亮等<sup>[12]</sup>利用温敏两用核不育系材料晶4155S选配出晶两优华占、晶两优1998、晶两优1212等42个通过国家审定的优质高产抗病新组合。廖卫琴等<sup>[13]</sup>利用细胞核雄性不育系ZHB1为母本,自交系ZHA12为父本配制而成的干鲜兼用朝天椒一代杂种绥辣1号,该品种中熟,株型紧凑,生长势强,连续坐果能力强。姬月梅等<sup>[14]</sup>引进大豆雄性核不育 $ms_1$ 群体材料,通过轮回选择育种技术构建宁夏春大豆种质基因库基础群体,选育出中晚熟高产优异新种质13LD222和12LD89。在不育基因研究方面,核不育型辣椒的不育性大多

由一对隐性核不育基因控制,少数由显性基因控制,与细胞质无关。目前,辣椒中已经报道的核不育基因将近20个,在中国发现的有3个(*msc-1*,*msc-2*,*msc-3*),且均为隐性核不育基因<sup>[15-16]</sup>。

简而言之,利用雄性不育系做母本生产杂种一代可简化制种程序,降低生产成本,提高种子纯度,因此开展辣椒雄性不育系研究具有广阔的应用前景。本研究对GMS702AB进行遗传规律分析、内源激素测定以及分子标记鉴定,结果表明试验材料GMS702AB为细胞核雄性不育系辣椒。该材料为深入研究辣椒花发育的分子机制和今后选育稳定的雄性不育系、培育优异辣椒新品种提供科学指导,并为花期调节等相关生产措施提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

材料来源于安徽省农业科学院园艺研究所蔬菜种质资源与遗传育种研究室,包括田间发现的疑似突变体细胞核雄性不育系辣椒,命名为GMS702AB,702A(母本)、702B(父本)、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>群体均定植在安徽省合肥市庐阳区岗集镇农业试验示范基地,其中亲本于2021年4月种植,F<sub>1</sub>于2021年9月种植,共4垄,每垄130株,共520株;F<sub>2</sub>于2022年4月种植127株,株距30 cm;F<sub>3</sub>于2022年9月共种植127个株系,每个株系30株,株距30 cm。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 细胞核雄性不育系 GMS702AB 自然授粉果实与单性结实农艺性状测定** 对GMS702AB F<sub>3</sub>可育系单株与不育系单株各100朵辣椒花进行人工去雄,进行3次重复,观察去雄后的单性结实情况。随机选择3株可育系自然授粉植株与可育系单性结实植株、不育系单性结实植株,记录可育系自然授粉果实与可育系单性结实、不育系单性结实坐果数、坐果率(坐果数/去雄辣椒花数×100%)以及无籽果

率(无籽果实/所有统计果实 $\times 100\%$ )。随机选择5株可育系的自然授粉果实与5株可育系的单性结实果实、5株不育系的单性结实果实,每株随机选择3个果实,利用游标卡尺测量果实纵横径。

**1.2.2 细胞核雄性不育系 GMS702AB 单性结实不同发育时期果实相关内源激素含量测定** 从田间取 GMS702AB 可育系植株与不育系植株辣椒未熟期、绿熟期、转色期、红熟期 4 个时期的果实样品,每个时期取 3 个果实,放进液氮中保存,然后进行植物内源激素赤霉素(GA4, gibberlin A4)、生长素(IAA, indole-3-acetic Acid)、脱落酸(ABA, abscisic acid)、玉米素核苷(ZR, trans-zeatin-riboside)的含量测定,激素含量利用酶联免疫吸附分析法测定<sup>[17]</sup>,试验设 3 次重复。

**1.2.3 遗传规律分析方法与数据处理** 利用田间发现的自然突变体细胞核雄性不育系辣椒 GMS702AB 中的不育系和可育系杂交得到 F<sub>1</sub> 分离群体,再将 F<sub>1</sub> 植株中可育株分别自交,获得包含隐性可育系植株和不育系植株的 F<sub>2</sub> 分离群体。为了确定可育系的基因型,再将 F<sub>2</sub> 植株中的可育系植株分别自交。通过育性分离情况鉴定出纯显性可育系植株和杂合体植株,完成 F<sub>2</sub> 群体的构建。然后通过田间鉴定和显微镜观察确定 F<sub>2</sub> 各植株的育性,统计其可育系植株和不育系植株的分离比例,并利用 Microsoft Excel 和 SPSS 软件进行处理和统计分析。

**1.2.4 分子标记检测** 取适量 GMS702AB 的 F<sub>2</sub> 与 F<sub>3</sub> 可育系与不育系辣椒幼嫩叶片装入 2 mL 离心管

中,并用黑色记号笔标明编号,随后将离心管迅速放入液氮中,F<sub>2</sub> 与 F<sub>3</sub> 可育系与不育系辣椒叶片样品取 3 次重复,采集好的辣椒叶片放入 -80℃ 冰箱保存。使用生工植物基因组提取试剂盒提取辣椒叶片 DNA,并置于 -80℃ 冰箱保存,用于后续试验。

利用表 1 中的 CAPS 引物,以上述 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,35 个循环;72℃ 延伸 7 min,最后 4℃ 保存。通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,以 150 V 电泳 20 min 后用凝胶扫描成像分析仪观察条带差异。

利用表 1 中的 SSR 与 InDel 引物,以上述 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,10 个循环(每个循环上升 0.5℃);10 个循环后,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,25 个循环;72℃ 延伸 6 min,最后 4℃ 保存。取 1.5 μL PCR 产物用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29:1,质量比)进行电泳检测,用 200 V 电泳 1.5 h 后用 0.1% 硝酸银溶液染色,最后用 X 射线胶片观片灯观察并记录结果。

利用文献中已报道的辣椒细胞核雄性不育系相关的不育基因 *ms-3*, *msw*, *ms*, *msms*, *msc-1* 以及获得的分子标记 H12(SSR)、H24(SSR)<sup>[18]</sup>, Indel-12(InDel)<sup>[19]</sup>, HPGMS2(CAPS)、HPGMS3(CAPS)、SPMS1(CAPS)<sup>[20]</sup>, PmsM1(CAPS)<sup>[15]</sup> 进行多态性检测。相关引物信息见表 1。

表 1 相关引物信息

Table 1 Related primer information

引物名称 Primer name	正向序列(5'-3') Positive sequence(5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')	标记类型 Marker type	不育基因 Sterile genes	片段大小(bp) Fragment size
H12	GTTCTATTAAGGGTGGTGAGGGT	CTCGCAGCAGATGGTAGTTAGT	SSR	<i>msms</i>	可育:85;不育:90
H24	TAAACACGGGATGCAGCTACTA	AAGTTCCTTTTCGTGTAACGACC	SSR	<i>msms</i>	可育:75;不育:150
Indel-12	GCCTGAAGTTCAAGTGGCTC	CCACAGATGCAGTAACAAGCA	InDel	<i>msc-1</i>	可育:176;不育:169
SPGMS1	TGCAGAAATGGATC	AGGATTACAAGGAGATGAA	CAPS	<i>msw</i>	可育:132;不育:111
HPGMS2	GGTACTTTGACCCTCATAATTGG	TTGTTTGTGGTGTACGTGCT	CAPS	<i>ms-3</i>	可育:140;不育:93、47
HPGMS3	GGGATGTTTCAGTCTCATGT	GACTTTTTCCCGATCTCGG	CAPS	<i>ms-3</i>	可育:93、35;不育:128
PmsM1	TGGGCTATCCCGTAAGCCAGCTCAT	GCCGAATCCCTTCATCCTATTTCTCT	CAPS	<i>ms</i>	可育:539;不育:445

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞核雄性不育系辣椒 GMS702AB 可育系与不育系单性结实果实农艺性状测定

如表 2 所示,GMS702AB 的可育系与不育系均

有单性结实性,且果实差异性大。不经过人工去雄的自然授粉坐果的可育系果实为细羊角形。可育系与不育系单性结实果实均为短指形,内无成熟种子,通过对可育系单株的 100 朵辣椒花进行人工去雄,并对人工去雄的辣椒花进行标记,最后共有 22

个单性结实果实,坐果率为 22%;通过对不育系单株的 100 朵辣椒花进行人工去雄,并对人工去雄的辣椒花进行标记,最后共有 43 个单性结实果实,坐

果率为 43%,远高于可育系的单性结实率。另外,不育系单性结实果实与可育系单性结实果实相比,纵横径较大,果实性状更优良(图 1)。

表 2 GMS702AB 可育系、不育系单性结实果实与可育系自然授粉果实农艺性状

Table 2 Agronomic traits of GMS702AB fertile line, sterile line parthenocarpic fruit and fertile line natural pollination fruit

果实 Fruit	处理 Treatment	坐果率(%) Percentage of consolidation of fertile fruit	无籽果率(%) Seedless fruit rate	果实纵径(cm) Fruit longitudinal diameter	果实横径(cm) Equatorial diameter of fruit
可育系单性结实果实 Fertile line parthenocarpic fruit	人工去雄	22	100	2.16±0.152	1.54±0.195
不育系单性结实果实 Sterile line parthenocarpic fruit	人工去雄	43	100	3.02±0.259	1.64±0.207
可育系自然授粉果实 Fertile line natural pollinated fruit	未进行人工去雄	100	0	16.76±0.416	1.82±0.130



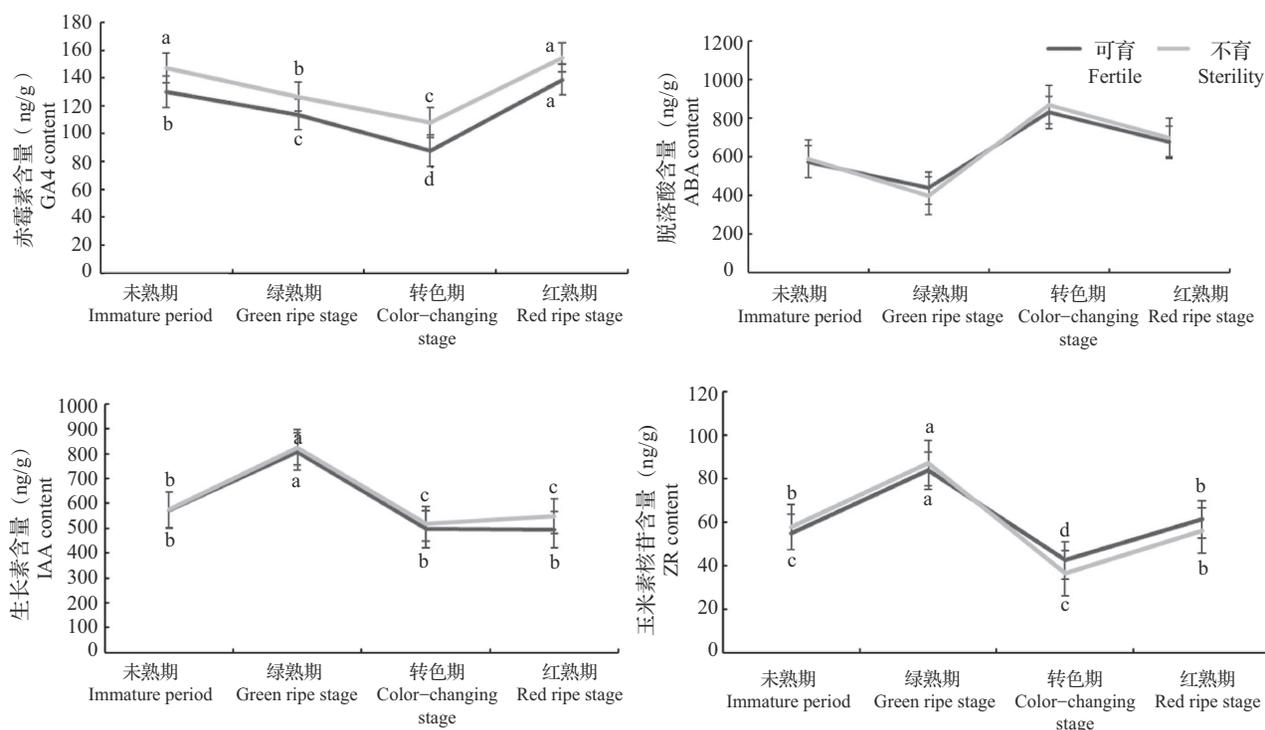
图 1 可育系单性结实果实(A)、不育系单性结实果实(B)与可育系自然授粉果实(C)  
Fig. 1 Fertile line parthenocarpic fruit (A), sterile line parthenocarpic fruit (B) and fertile line natural pollination fruit (C)

## 2.2 细胞核雄性不育系辣椒 GMS702AB 可育系与不育系单性结实果实相关内源激素含量变化

**2.2.1 赤霉素含量比较分析** 由图 2 可以看出可育系单性结实果实内赤霉素含量与不育系单性结实果实内赤霉素含量整体均呈先下降后上升的趋势;每个时期不育系单性结实果实内的赤霉素含量与不育系单性结实果实内赤霉素含量都有着显著的差异,且不育系单性结实果实的赤霉素含量在整个发育期均高于可育系单性结实;两者的赤霉素含量均在辣椒红熟期达到了最大值,其中不育系单性结实果实内的赤霉素最大值为 154.65 ng/g,可育系

单性结实果实内的赤霉素最大值为 138.87 ng/g。

**2.2.2 脱落酸含量比较分析** 由图 2 可以看出可育系单性结实果实内的脱落酸含量与不育系单性结实果实内的脱落酸含量变化趋势相似,各时期两者的脱落酸含量差异并不显著,但是不育系单性结实果实内的脱落酸含量只在绿熟期低于可育系单性结实,其余时期均高于可育系单性结实果实内的脱落酸含量;且两者的脱落酸含量均在转色期达到了最大值,其中不育系单性结实果实内的脱落酸最大值为 870.5 ng/g,可育系单性结实果实内的脱落酸最大值为 830.5 ng/g。



图中不同小写字母分别表示 $P < 0.05$ 的显著性差异

Different lowercase letters in the figure represent significant differences at  $P < 0.05$  level

图2 可育系单性结实果实与不育系单性结实果实不同发育时期4个激素含量比较

Fig.2 Comparison of four hormone contents in parthenocarpic fruits of fertile lines and sterile lines at different developmental stages

**2.2.3 生长素含量比较分析** 由图2可以看出可育系单性结实果实内的生长素含量与不育系单性结实果实内的生长素含量整体均呈先上升后下降的趋势;但是不育系单性结实果实内的生长素含量在整个发育期略微高于可育系单性结实;两者的生长素含量在绿熟期就达到了最大值,其中不育系单性结实果实内的生长素最大值含量为825.37 ng/g,可育系单性结实果实内的生长素最大值为808.68 ng/g。

**2.2.4 玉米素核苷含量比较分析** 由图2可以看出可育系单性结实果实内的玉米素核苷含量与不育系单性结实果实内的玉米素核苷含量变化趋势相似,但是不育系单性结实果实内的玉米素核苷含量在未熟期和绿熟期均略高于可育系单性结实果实内的玉米素核苷含量,在转色期和红熟期中可育系单性结实果实内的玉米素核苷含量明显高于不育系单性结实果实的玉米素核苷含量;两者的玉米素核苷含量均在绿熟期达到了最大值,其中不育系单性结实果实内的玉米素核苷最大值为87.07 ng/g,可育系单性结实果实内的玉米素核苷最大值为

83.62 ng/g。

### 2.3 细胞核雄性不育系 GMS702AB 遗传规律分析

在辣椒开花期,通过田间观察可以确定辣椒花的可育性与不育性,并且利用显微镜对 GMS702AB 花粉镜检发现,可以明显区分可育花与不育花,可育花的花粉粒圆润饱满,数量极多;不育花没有完整的花粉粒,数量少且碎片多(图3)。

通过田间观察和显微镜鉴定, GMS702AB 的  $F_2$  群体中共有可育系植株 97 株,不育系植株 30 株。  $F_2$  群体中的可育系植株和不育系植株的分离比例为 3.23:1(表3),经卡方检验后,卡方值小于 3.84,不具有显著差异,符合 3:1 分离比,说明育性性状的遗传符合孟德尔遗传规律,由一对隐性的单基因控制。

### 2.4 细胞核雄性不育系辣椒分子标记鉴定

**2.4.1 基于 CAPS 对 GMS702AB 材料分析** 将筛选出的 HPGMS2、HPGMS3、SPGMS1<sup>[20]</sup>、PmsM1<sup>[15]</sup> 等引物在 GMS702AB  $F_3$  可育系与不育系上进行 PCR 扩增,利用扩增条带鉴定育性分离情况。如图4所示, HPGMS2 在 GMS702AB 可育系植株和不育系植株中扩增长度均为 140 bp; HPGMS3 在 GMS702AB

可育系植株和不育系植株中均可扩增出两条带,条带长度均为100 bp和500 bp;SPGMS1在GMS702AB可育系植株和不育系植株中扩增长度均为95 bp;PmsM1在GMS702AB可育系植株和不育系植株中扩增两条带,条带长度均为98 bp和500 bp。综上所述,

HPGMS2、HPGMS3、SPGMS1和PmsM1引物在本研究材料GMS702AB的可育系植株扩增条带与不育系扩增条带都不具有多态性,因此这4种引物均无法区分GMS702AB的可育系与不育系。

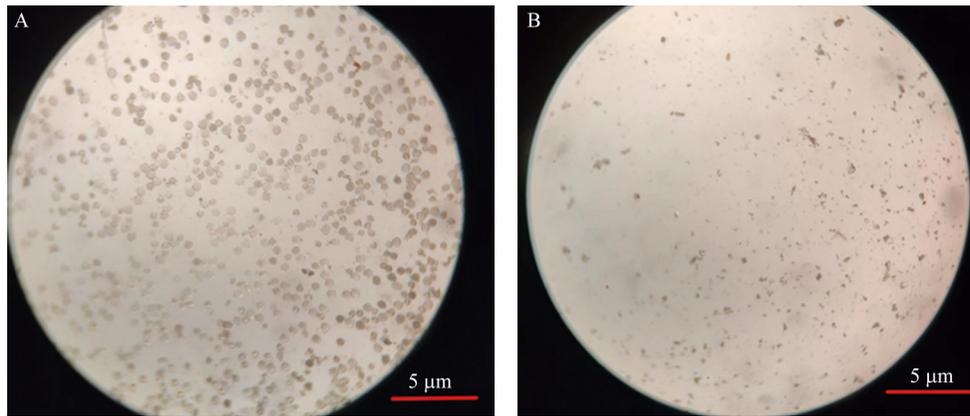


图3 10×镜下GMS702AB可育花粉粒(A)与不育花粉粒(B)镜检图

Fig 3 10×microscopic examination of GMS702AB fertile pollen grains (A) and sterile pollen grains (B)

表3 GMS702AB F<sub>2</sub>群体育性分离情况

Table 3 GMS702AB F<sub>2</sub> group fertility separation situation

群体 Population	可育株数 Number of fertile plants	不育株数 Number of sterile plants	总株数 Total plants	分离比 Separation distance ratio	$\chi^2$	显著性 Significance
F <sub>2</sub>	97	30	127	3.23:1	1.33	不显著

$\chi^2_{0.05,1}=3.84$

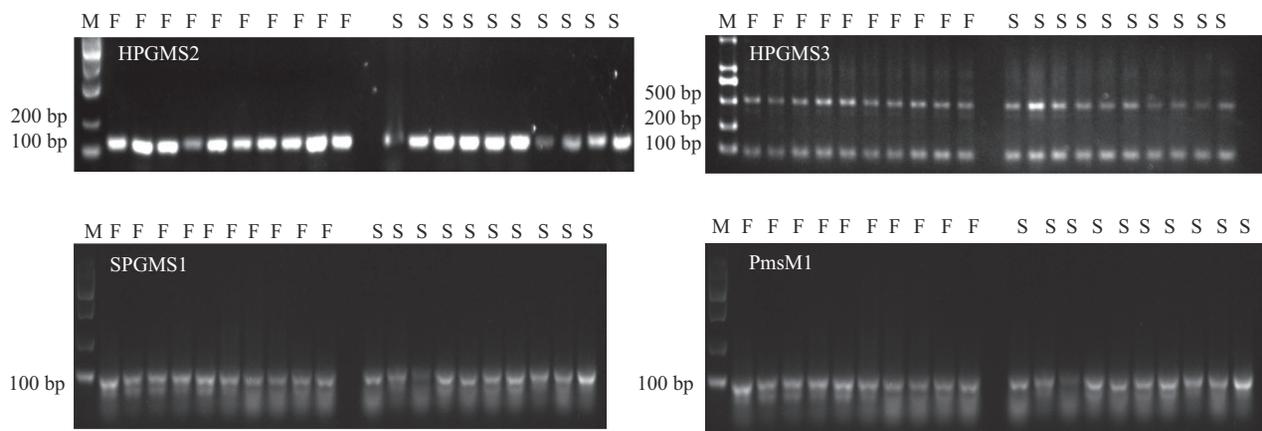


图4 HPGMS2、HPGMS3、SPGMS1、PmsM1对GMS702AB F<sub>3</sub>可育(F)、不育(S)材料育性鉴定条带

Fig.4 Fertility identification bands of GMS702AB F<sub>3</sub> fertile (F) and sterile (S) materials by HPGMS2, HPGMS3, SPGMS1 and PmsM1

**2.4.2 基于InDel对GMS702AB材料分析** 如图5所示,Indel-12引物在GMS702AB可育系植株和不育系植株中扩增条带长度均为176 bp,该引物同样无法区分GMS702AB材料的可育系与不育系。

**2.4.3 基于SSR对GMS702AB材料分析** 筛选出的2个SSR引物分别为H12、H24<sup>[18]</sup>,如图6所示,

H12引物在GMS702AB可育系植株和不育系植株中扩增条带长度均为120 bp;H24引物在GMS702AB可育系植株和不育系植株中扩增条带长度均为150 bp,这两种引物均无法区分GMS702AB材料的可育系与不育系。

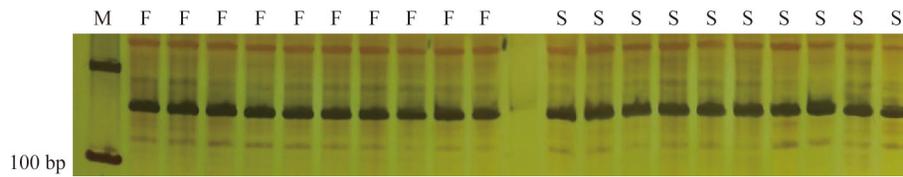
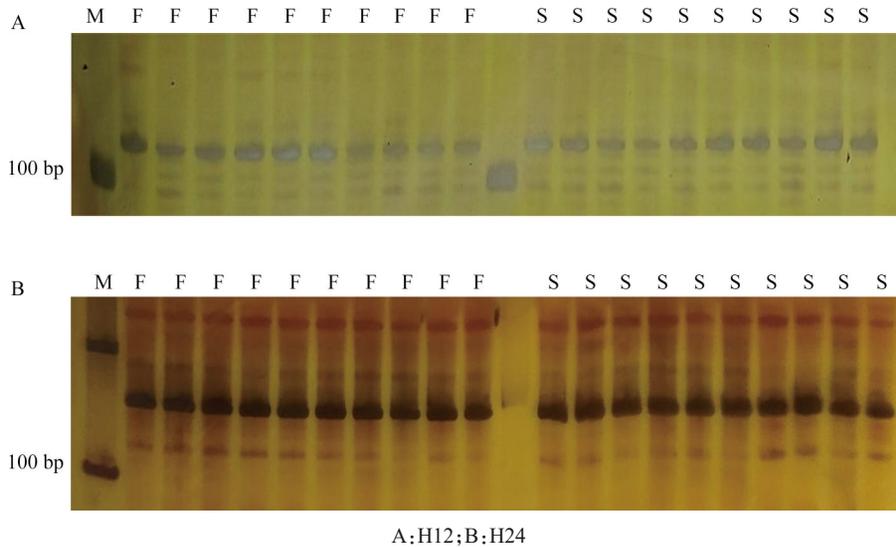


图5 Indel-12对GMS702AB F<sub>3</sub>可育(F)、不育(S)材料育性鉴定条带

Fig.5 Fertility identification bands of GMS702AB F<sub>3</sub> fertile (F) and sterile (s) materials by Indel-12



A:H12;B:H24

图6 H12、H24对GMS702AB F<sub>3</sub>可育(F)、不育(S)材料育性鉴定条带

Fig.6 Fertility identification bands of GMS702AB F<sub>3</sub> fertile (F) and sterile (S) materials by H12 and H24

### 3 讨论

#### 3.1 内源激素对可育系与不育系单性结实果实的影响

单性结实是指植物不经过受精就可以正常结果的现象,一般由植物在自然演化中发生变异而来<sup>[21]</sup>。番茄的单性结实资源一般都由远缘杂交得到,目前被广泛研究的番茄单性结实材料有3个,主要为Montfavet 191、Severianin、RP75/79<sup>[22]</sup>。有关茄子的单性结实资源较多,目前被研究较多的资源有单性结实体系QZ/4<sup>[23]</sup>、圆茄自交系中选育得到的D-10、D-11、D-21等<sup>[24-26]</sup>。有关辣椒单性结实资源较少,目前被研究的材料单性结实性品系Shishitgh<sup>[27]</sup>、07-33<sup>[28]</sup>。通过田间观察发现,本研究材料GMS702AB为新的单性结实材料。

Gustanfson<sup>[29]</sup>在研究单性结实时发现,在单性结实的果实中,虽然没有种子,但在新梢先端合成的生长素和赤霉素,仍然与同化物质一起运输向果实,并且在这类果实没受精的胚珠中,也进行着植物激素的合成,因此,激素物质对单性结实起着重要的作用。

尽管供试辣椒材料GMS702AB不育系单性结

实果实中的赤霉素含量与可育系单性结实果实中的赤霉素含量在各个时期变化趋势几乎一致,且均在红熟期达到顶峰。但不育系单性结实的赤霉素含量明显高于可育系单性结实,并在果实生长发育后期保持较高水平,且不育系单性结实与可育系单性结实的果实大小也有显著性差异,不育系单性结实果实性状更加优良,表明赤霉素对不育系单性结实确实有着重要作用。而如图2所示,脱落酸、生长素、玉米素核苷含量在不育系单性结实果实与可育系单性结实果实中的差异并不显著,但总体而言仍然是不育系单性结实的激素含量高于可育系单性结实。

#### 3.2 细胞核雄性不育系的分子标记开发与鉴定

植物雄性不育基因大多数来源于自然突变,大自然间各种射线的辐射导致植株体内调控育性的基因出现有益突变,并在子代中得到保存和传递。1951年,Martin等<sup>[30]</sup>首次报道了由隐性单基因控制的辣椒雄性不育材料。核不育型的不育性大多由一对隐性核不育基因控制,少数由显性基因控制,与细胞质无关。目前,辣椒中已经报道的核不育基因将近20个,即ms-1、ms-2至ms-9、ms-10、ms-11、ms-12至ms-15、msc-1、msc-2和msk等<sup>[31]</sup>。除了1个

被命名为 *Dms* 的基因由显性基因控制外<sup>[32]</sup>, 其余都由隐性基因所控制。 *msc-1* 是中国最早发现的 1 个隐性核不育基因, 在杂交种生产中也应用较为广泛。范妍芹等<sup>[33]</sup>利用 *AB91* 核雄性不育候选基因设计的 KASP 分子标记, 筛选出基因型为 MSms 的可育株, 并用于不育系的转育, 成功转育出了黄色和红色甜椒核雄性不育两用系 AB91-HTJ412 和 AB91-HLD163。Lee 等<sup>[34]</sup>发现 *GMS1* 为 1 个隐性单基因控制的辣椒细胞核雄性不育系; Lee 等<sup>[35]</sup>利用 NW1 系构建了 1 个辣椒细胞核雄性不育  $F_2$  分离群体, 利用集群分离分析法和扩增片段长度多态性技术获得了 1 个与甜椒细胞核雄性不育连锁的标记。杨凤梅<sup>[36]</sup>利用人工选育和自交的方法率先选育出一系列雄性不育两用系<sup>[36]</sup>。任锡伦<sup>[37]</sup>以沈椒 4 号辣椒作为不育源转育成 3 个雄性不育两用系, 并应用于育种实践。沈火林等<sup>[19]</sup>利用细胞核雄性不育两用系 09C460AB 辣椒为材料, 开发分子标记并应用于田间育性鉴定。Naresh 等<sup>[20]</sup>利用核不育材料 Novator 和 PBC315 杂交的  $F_2$  植株开发分子标记, 并将分子标记应用于苗期鉴定辣椒育性。Dong 等<sup>[38]</sup>发现 1 个新的辣椒 GMS 突变体 *msc-3*, 怀疑其花粉败育源于绒毡层退化延迟导致四分体胼胝质壁不能正常退化。

目前发现的辣椒细胞核雄性不育系材料, 可以用于挖掘相关不育基因, 开发分子标记并鉴定田间植株育性, 推动杂交种生产, 也可以用于种质资源的创制, 降低杂交种种子生产成本, 保证种子纯度等, 但是辣椒的不育性还是受到多种因素的制约。一些不育系材料容易受外界因素的影响改变育性, 如光敏性不育和温敏性不育<sup>[39-40]</sup>, 一旦出现这种情况将会产生巨大的经济损失; 并且利用两用系制种时, 需要进行大量的播种和种植, 极大的增加了生产成本。因此进一步创制稳定的核不育型辣椒材料, 丰富辣椒雄性不育资源, 可以充分发挥辣椒杂种优势, 对群体性状改良也有着指导作用, 同时继续深入挖掘新的不育基因, 在生产中将产生极高的应用价值。

本研究通过构建辣椒细胞核雄性不育系 GMS702AB 的  $F_2$  基础群体, 并对其遗传规律分析, 确定了不育性状由单基因控制; 然后从文献中筛选出已发表的辣椒细胞核雄性不育系材料相关的 7 对标记, 在 GMS702AB 上进行扩增, 发现 7 对引物的扩增条带均无法区分本材料的可育系与不育系, 表明这 7 个标记与本试验材料细胞核雄性不育

系没有关系。但标记 Indel-12 在可育系与不育系间的区别只有 9 个 bp, 通过琼脂糖电泳与聚丙烯酰胺凝胶电泳很难鉴定, 无法确定 GMS702AB 的不育是由哪个基因引起的, 所以只能确定 GMS702AB 是一个具有单性结实特性的细胞核雄性不育系, 后续本课题组将挖掘 GMS702AB 的不育基因, 开发分子标记, 以确定 GMS702AB 是否为一个新型的辣椒细胞核雄性不育系材料。本研究结果将为辣椒种质创制提供重要的材料来源, 同时也有效推动核不育系在辣椒育种和种子生产中的应用, 将在生产中产生极高的应用价值。

#### 参考文献

- [1] Cheng J W, Qin C, Tang X, Zhou H K, Hu Y F, Zhao Z C. Development of a SNP array and its application to genetic mapping and diversity assessment in pepper (*Capsicum spp.*). *Scientific Reports*, 2016, 6: 33293
- [2] Wang D, Bosland P W. The genes of Capsicum. *HortScience*, 2006, 41: 1169-1187
- [3] 邹学校, 马艳青, 戴雄泽, 李雪峰, 杨莎. 辣椒在中国的传播与产业发展. *园艺学报*, 2020, 47(9): 1715-1726
- [4] Zou X X, Ma Y Q, Dai X Z, Li X F, Yang S. The spread and industrial development of pepper in China. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(9): 1715-1726
- [5] 邵贵芳, 张凡, 王姣, 赵凯, 莫云荣. 辣椒雄性不育的研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33(8): 7-13
- [6] Shao G F, Zhang F, Wang J, Zhao K, Mo Y R. Research progress of pepper male sterility. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(8): 7-13
- [7] Jindal S K, Dhaliwal M S, Meena O P. Molecular advancements in male sterility systems of Capsicum: A review. *Plant Breeding*, 2020, 139(1): 12757-12767
- [8] 吴国平. 甜椒 CMS 育性相关基因的分子标记筛选与应用. 南京: 南京农业大学, 2012
- [9] Wu G P. Molecular marker screening and application of CMS fertility related genes in sweet pepper. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [10] Chen L T, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual Reviews in Plant Biology*, 2014: 65, 579-606
- [11] Chang Z Y, Chen Z F, Wang N, Xie G, Lu J W, Yan W. Construction of a male sterility system for hybrid rice breeding and seed production using a nuclear male sterility gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 2019, 113: 14145-14150
- [12] Wang H, Deng X W. Development of the "third-generation" hybrid rice in China. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 2018, 16: 393-396
- [13] Wang Z, Li J, Chen S X, Heng Y F, Chen Z, Yang J. Poaceae-specific *MS1* encodes a phospholipid-binding protein

- for male fertility in bread wheat. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114: 12614-12619
- [11] Du M M, Zhou K, Liu Y Y, Deng L, Zhang X Y, Lin L H. A biotechnology-based male-sterility system for hybrid seed production in tomato. The Plant Journal, 2020, 102: 1090-1100
- [12] 张维亮,黄凯,张帅,胡冬生,陈同明.水稻两用核不育系晶4155S特征特性及其组合高产制种技术.作物研究,2021,35(5):530-533  
Zhang W L, Huang K, Zhang S, Hu D S, Chen T M. Characteristics of rice dual-purpose genic male sterile line Jing 4155S and its combined high-yield seed production technology. Crop Research, 2021, 35 (5): 530-533
- [13] 廖卫琴,任朝辉,郑燕,田浩.辣椒新品种“绥辣1号”的选育.北方园艺,2023(6):158-160  
Liao W Q, Ren C H, Zheng Y, Tian H. Breeding of a new hot pepper variety 'Suila No. 1'. Northern Horticulture, 2023 (6): 158-160
- [14] 姬月梅,罗瑞萍,连金番,赵志刚.利用大豆雄性核不育基因 *ms1* 创制春大豆新种质及其在育种中的应用.大豆科技,2022(1):9-13  
Ji Y M, Luo R P, Lian J F, Zhao Z G. Using soybean male sterile gene *ms1* to create new spring soybean germplasm and its application in breeding. Soybean Science and Technology, 2022(1):9-13
- [15] Jeong K, Choi D, Lee J. Fine mapping of the genic male-sterile *ms1* gene in *Capsicum annuum* L.. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131:183-191
- [16] 邵元健,吴雯雯,沈素香,赵闪闪.辣椒雄性核不育基因的遗传研究及其在杂交育种中的应用.热带亚热带植物学报,2013,21(1):93-99  
Shao Y J, Wu W W, Shen S X, Zhao S S. Genetic study of male sterile gene in pepper and its application in hybrid breeding. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2013, 21(1):93-99
- [17] 丁静,沈镇德,方亦雄,冯秀香,李琳.植物内源激素的提取分离和生物鉴定.植物生理学通讯,1979(5):27-39  
Ding J, Shen Z D, Fang Y X, Feng X X, Li L. Extraction, separation and biological identification of plant endogenous hormones. Plant Physiology Communication, 1979(5):27-39
- [18] 孟雅宁,严立斌,田玉,范妍芹.利用重测序 InDel 位点开发甜椒隐性核不育分子标记.分子植物种,2019,17(18):6041-6046  
Meng Y N, Yan L B, Tian Y, Fan Y Q. Development of molecular markers for recessive nuclear sterility in sweet pepper by resequencing InDel loci. Molecular Plant Species, 2019, 17(18):6041-6046
- [19] 沈火林,程青.CN108148920B 辣椒细胞核雄性不育相关基因的功能型分子标记及其应用.北京:中国农业大学,2021  
Shen H L, Cheng Q. CN108148920B functional molecular markers and application of pepper nuclear male sterility related genes. Beijing: China Agricultural University, 2021
- [20] Naresh P, Lin S W, Lin C Y, Wang Y W, Schafleitner R, Kilian A, Kumar S. Molecular markers associated to two non-allelic genic male sterility genes in peppers (*Capsicum annuum* L.). Frontiers in Plant Science, 2018, 9:1343
- [21] 南思楠,邹薛,闫道良.植物单性结实的发生诱因及其机制研究.安徽林业科技,2021,47(5):11-15  
Nan S N, Zou X, Yan D L. Study on the inducement and mechanism of plant parthenocarpy. Anhui Forestry Science & Technology, 2021, 47 (5):11-15
- [22] 张祥胜,陈日远,刘厚诚.蔬菜单性结实研究进展//中国园艺学会.中国园艺学会第五届青年学术讨论会论文集.广州:华南农业大学园艺学院,2002:396-404  
Zhang X S, Chen R Y, Liu H C. Research progress on parthenocarpy of vegetables//Chinese Horticultural Society. Proceedings of the Fifth Youth Academic Seminar of Chinese Horticultural Society. Guangzhou: College of Horticulture, South China Agricultural University, 2002: 396-404
- [23] 成玉富,薛萍,张金凤.茄子单性结实习性的研究.中国蔬菜,2008,3(2):29-31  
Cheng Y F, Xue P, Zhang J F. Research on parthenospermy of eggplant. China Vegetables, 2008, 3(2) 29-31
- [24] 刘富中,连勇,陈钰辉,宋燕.温度和蕾期去雄及去柱头处理对茄子单性结实性的影响.园艺学报,2005,32(6):1021-1025  
Liu F Z, Lian Y, Chen Y H, Song Y. Effects of temperature and bud stage emasculation and stigma removal on parthenocarpy of eggplant. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (6):1021-1025
- [25] 潘秀清,武彦荣,高秀瑞.茄子单性结实材料D-11的发现.华北农学报,2005,20(6):33  
Pan X Q, Wu Y R, Gao X R. The discovery of eggplant parthenocarpic material D-11. Journal of North China Agriculture, 2005, 20(6):33
- [26] 李艳玮,刘富中,陈钰辉,张映,张伟伟.温度对茄子单性结实子房(果实)发育过程中内源激素含量的影响.中国蔬菜,2013(22):32-38  
Li Y W, Liu F Z, Chen Y H, Zhang Y, Zhang W W. Effect of temperature on endogenous hormone content during parthenocarpic ovary (fruit) development in eggplant. Chinese Vegetables, 2013(22):32-38
- [27] Ichiro H, Hiroshi M, Kaori K. Identification of pepper (*Capsicum annuum* L.) accessions with large or small fruit that have a high degree of parthenocarpy. Scientia Horticulturae, 2012, 135:68-70
- [28] 张金凤.辣椒单性结实习性、生理特性及遗传规律的研究.扬州:扬州大学,2009  
Zhang J F. Study on the parthenocarpy habit, physiological characteristics and genetic law of pepper. Yangzhou: Yangzhou University, 2009
- [29] Gustafson F G. The cause of natural parthenocarpy. American Journal of Botany, 1939, 26:135-138

- [30] Martin J, Crawford J H. Several types of sterility in *Capsicum frutescens*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1951, 57:335
- [31] Dhaliwal M S, Jindal S K. Induction and exploitation of nuclear and cytoplasmic male sterility in pepper (*Capsicum spp*): A review. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2014, 89:471-479
- [32] Daskalov S, Poulos J M. Updated Capsicum gene list. Capsicum and Eggplant Newsletters, 1994, 13:16-26
- [33] 范妍芹, 严立斌, 孟雅宁, 张红肖. KASP 分子标记辅助选育甜椒核雄性不育两用系. 中国蔬菜, 2022(12):38-44  
Fan Y Q, Yan L B, Meng Y N, Zhang H X. KASP molecular marker-assisted breeding of sweet pepper nuclear male sterile dual-purpose line. Chinese Vegetables, 2022 (12):38-44
- [34] Lee J, Yoon J B, Han J H. A codominant SCAR marker linked to the genic male sterility gene (*ms1*) in chili pepper (*Capsicum annuum*). Plant Breeding, 2010, 129(1):35-38
- [35] Lee H, Hye Jung An, Dong Cheol Yang. 一个与辣椒细胞核雄性不育性状连锁的高分辨率熔解曲线(HRM)标记的开发. 辣椒杂志, 2012, 10(4):44-49  
Lee H, Hye J A, Dong C Y. Developed a high-resolution melting curve (HRM) marker linked to the nuclear male sterility trait in pepper. Pepper Journal, 2012, 10 (4):44-49
- [36] 杨凤梅, 薛庆华. 辣椒雄性不育两用系选育及其利用. 辣椒杂志, 2005(2):9-10  
Yang F M, Xue Q H. Breeding and utilization of pepper male sterile dual-purpose line. Pepper Journal, 2005(2):9-10
- [37] 任锡伦. 辣椒雄性不育三系及两用系配套栽培技术的研究及系列相关品种的培育. 吉林蔬菜, 2004(6):34-35  
Ren S L. Study on the supporting cultivation techniques of three-line and dual-purpose male sterile pepper and the cultivation of a series of related varieties. Jilin Vegetables, 2004(6):34-35
- [38] Dong J, Hu F, Guan W, Yuan F, Lai Z, Zhong J, Liu J, Wu Z, Cheng J, Hu K. A 163-bp insertion in the Capana10g000198 encoding a MYB transcription factor causes male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.). The Plant Journal, 113 (3): 521-535
- [39] 韦永贵, 董卓娅, 张晓磊, 段自林, 罗龙. 水稻光温敏核不育系的组织培养研究进展. 农业与技术, 2017, 37(20):7-8, 19  
Wei Y G, Dong Z Y, Zhang X L, Duan Z L, Luo L. Research progress on tissue culture of rice photo-thermo-sensitive genic male sterile line. Agriculture and Technology, 2017, 37(20): 7-8, 19
- [40] 刘科伟, 王述彬, 刁卫平, 戈伟. 辣椒细胞质雄性不育相关基因的克隆与表达分析. 北方园艺, 2017(8):90-95  
Liu K W, Wang S B, Diao W P, Ge W. Cloning and expression analysis of cytoplasmic male sterility related genes in pepper. Northern Horticulture, 2017(8):90-95