

细胞骨架与小麦雄性不育关系研究初报

姚雅琴, 李 蓓, 张英利, 牛 娜, 张改生

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 以T型细胞质雄性不育(CMS)、化学杂交剂(CHA)诱导的雄性不育及成熟可育的花粉粒为材料, 用考马斯亮蓝 R250 显示细胞内微丝的方法, 观察分析了3种类型花粉粒内微丝结构的变化。结果表明, 成熟可育花粉粒内微丝多以多聚体的形式存在, 呈连续排列的网状结构且充满整个花粉粒; 而其他两种不育花粉粒内, 连续排列的网状结构被破坏而呈颗粒状或短棒状结构, 收缩集中分布于花粉粒中部, 花粉粒周缘缺乏, 且T型细胞质雄性不育系的内微丝含量较化学杂交剂诱导的雄性不育花粉粒的少。

[关键词] 细胞骨架; 小麦; CMS; CHA

[中图分类号] S512.101; Q942.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)12-0039-04

雄性不育是杂种优势利用的基础, 小麦常采用的不育类型有细胞质雄性不育(CMS)和化学杂交剂(CHA)诱导的雄性不育。有关雄性不育形成机理的研究报道很多, 有DNA水平^[1,2]、蛋白质水平^[3,4]、结构水平^[5]和生理水平^[6]等, 但到目前为止, 有关细胞骨架结构与雄性不育关系方面的研究还比较鲜见。本研究以细胞质雄性不育(CMS)和化学杂交剂(CHA)诱导的雄性不育以及成熟可育的花粉粒为材料, 采用考马斯亮蓝 R250 显示细胞内微丝的方法, 在显微镜下观察了微丝的结构及其分布变化特征, 并探讨了其变化与雄性不育发生的关系, 旨在为小麦细胞质雄性不育系败育机理和微丝骨架的功能, 以及这两者之间关系的研究提供新的研究角度和思路。

1 材料与方法

1.1 材 料

选用T-77(2)小麦细胞质雄性不育和化学杂交剂诱导的雄性不育以及正常77(2)小麦成熟可育的花粉粒为材料, 均采自于西北农林科技大学农学院实验地。

1.2 方 法

1.2.1 扫描电镜样品的制备与观察 取适当的花粉粒, 通过双面胶带纸直接粘在样品台上, 用IB-5(EIKO)离子溅射仪喷镀5 min, 日立S-450扫描电镜观察、拍照。

1.2.2 细胞内微丝结构的样品制备与观察 ①水合花粉。将花药置于 Φ 7 cm的小平皿中, 加入少量蒸馏水, 用平头玻棒压出花粉粒后, 再用细玻棒轻轻搅拌1 h。②酶解花粉。将上述处理的花粉悬液用400目不锈钢滤网过滤除去花药壁残渣, 并将花粉转入酶解液(甘露醇0.8 mol/L, 蔗糖1 mol/L, 纤维素酶10 g/L, 果胶酶10 g/L)中, 室温下酶解6~7 h, 3 000 r/min离心15 min, 弃上清。③蛋白抽提。加入体积分数1%的Triton X-100抽提45 min, 3 000 r/min离心15 min, 弃上清, 然后用M缓冲液(见参考文献[7])冲洗3次, 每次15 min, 3 000 r/min离心15 min, 弃上清。④骨架蛋白固定。加入体积分数3%戊二醛固定液4℃固定1 h, 3 000 r/min离心15 min, 弃上清, 用0.2 mol/L pH 6.8磷酸缓冲液冲洗3次, 每次15 min, 3 000 r/min离心15 min, 弃上清。⑤骨架蛋白染色。加入2 g/L考马斯亮蓝R250染色1 h, 3 000 r/min离心15 min, 弃上清, 蒸馏水冲洗3次, 每次10 min。⑥制片镜检。吸取上述处理的花粉液1滴, 滴于载玻片上, 加盖盖玻片, 分别于40×下镜检观察, 选择染色清晰的样品制成永久封片。⑦永久封片制作。将染色后的花粉粒依次经下列试剂分别处理10 min: 体积分数50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、乙醇+二甲苯(体积比为1:1)、二甲苯, 然后用中性树胶封片。⑧样品拍照。样品在E600光学显微镜下观察、拍照。

[收稿日期] 2005-09-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39770366); 国家杨凌农业生物技术育种中心基金项目

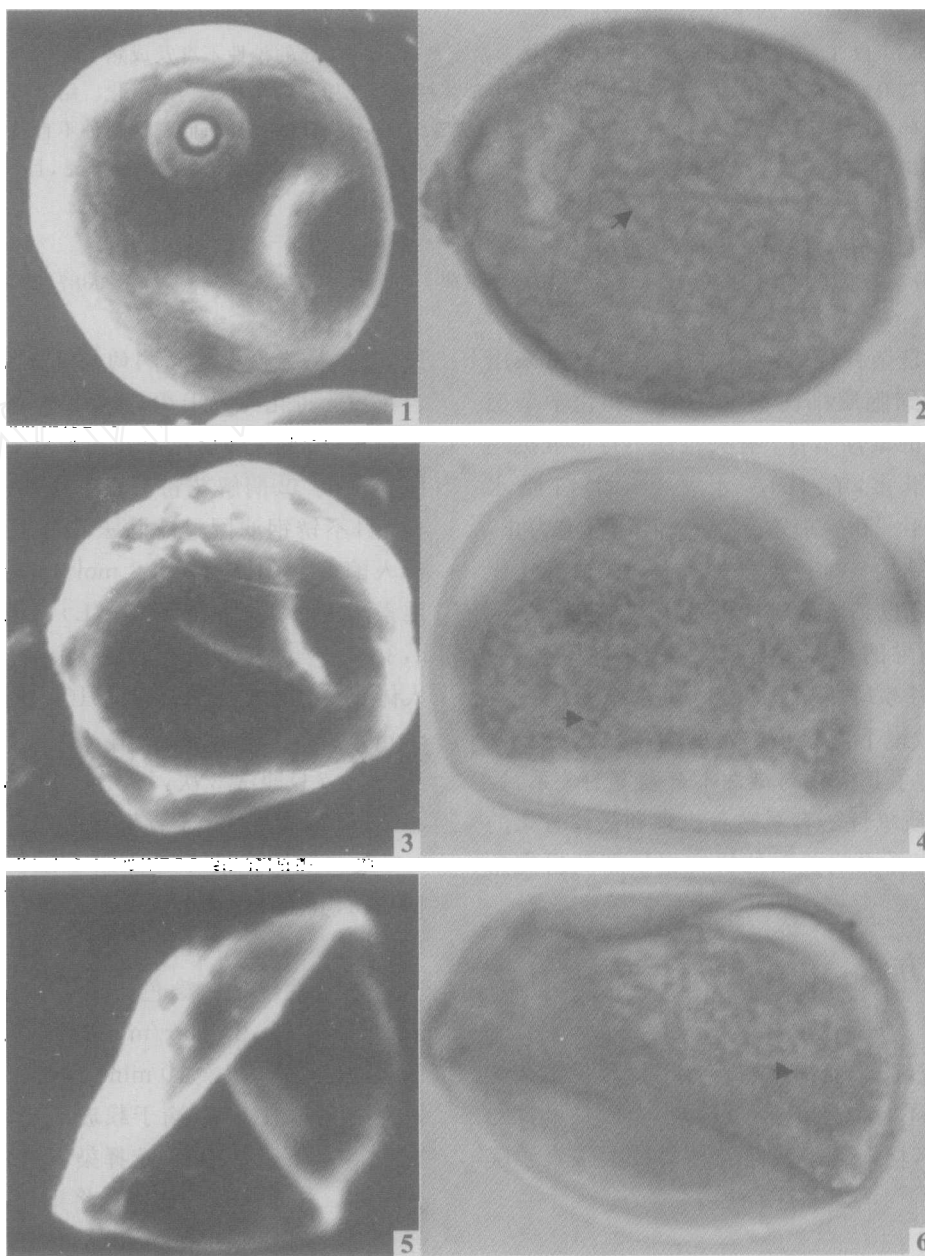
[作者简介] 姚雅琴(1957—), 女, 陕西澄城人, 教授, 主要从事小麦细胞质雄性不育机理研究。

2 结果与分析

2.1 正常可育花粉粒的外部结构和内部微丝的分布特征

在显微镜下观察可见,正常可育的成熟花粉粒

呈近球形,表面有多处凹陷,具单萌发孔,有明显加厚的孔环(Annulus)和外突的孔盖(Operculum)(图版 I-1)。花粉粒内微丝多以多聚体的形式存在,呈连续排列的网状结构充满整个花粉粒(图版 I-2)。



图版 I 小麦 3 种类型花粉粒的形态和微丝结构观察

1. 可育花粉粒, 1 100 $\times$; 2. 可育花粉粒内的微丝结构, 1 200 $\times$ (箭头指微丝); 3. 化学杂交剂诱导的不育花粉, 1 100 $\times$;
4. 化学杂交剂诱导的不育花内的微丝结构, 1 300 $\times$ (箭头指微丝); 5. T 型细胞质雄性不育花粉粒, 1 150 $\times$;
6. T 型细胞质雄性不育花粉粒内的微丝结构, 1 300 $\times$ (箭头指微丝)

Plate I Shapes and microfilament of three pollen on wheat

1. Mature fertile pollen, 1 100 $\times$; 2. Microfilaments in mature fertile pollen, 1 200 $\times$ (arrowheat);
3. Sterile pollene of CHA, 1 100 $\times$; 4. Microfilaments in terile pollen of CHA, 1 300 $\times$ (arrowheat);
5. Sterile pollene of T-CMS, 1 150 $\times$; 6. Microfilaments, in sterile pollen of T-CMS, 1 300 $\times$ (arrowheat)

2.2 化学杂交剂诱导的雄性不育花粉粒的外部结构和内部微丝的分布特征

化学杂交剂诱导的雄性不育花粉粒的败育多发生在二核花粉粒和三核花粉粒时期,败育时的花粉呈扁球形或不规则形状(图版 I-3)。连续排列的微丝结构被破坏,花粉粒内微丝结构趋于解体,收缩集中分布于花粉粒中部,花粉粒周缘缺乏,形状呈颗粒状或短棒状(图版 I-4)。

2.3 T 型细胞质雄性不育花粉粒的外部结构和内部微丝的分布特征

T 型雄性不育花粉粒的败育多发生在单核小孢子后期,由于细胞质和细胞核解体,败育的花粉呈扁三角形或帽状结构(图版 I-5)。花粉粒内微丝结构和分布特征的变化与化学杂交剂诱导的雄性不育花粉粒基本相似,但明显较杂交剂诱导的雄性不育花粉粒内的微丝少(图版 I-6)。

3 讨 论

细胞骨架主要由微丝、微管和中间纤维 3 部分组成。本研究选用的考马斯亮蓝染色的方法主要显示的是微丝结构^[7],微丝又称肌动蛋白纤丝,是指真核细胞中由肌动蛋白组成的,直径为 7 nm 的骨架纤维^[8],由 Condeelis^[9]在电镜下首先证实了植物花粉粒中含有肌动蛋白。Pierson 等^[10]和刘国琴等^[11]分别用鬼笔环肽和考马斯亮蓝 R250 染色法观察到了植物花粉粒中的微丝结构。阎隆飞等^[12]通过分离、纯化和凝胶电泳检测的方法,比较研究了小麦保持系和不育系花药中肌动蛋白的含量变化,结果表明两者之间的含量存在明显差异。在本试验中,用考马斯亮蓝 R250 显色法,观察了正常可育花粉粒和两种不育类型花粉粒内的微丝结构、分布状况和相

对含量的变化,结果发现,作为细胞骨架主要成分之一的微丝,在可育花粉粒与不育花粉粒之间,不仅存在量上的差异,而且存在结构和分布位置上的差异。主要表现为:在成熟可育的花粉粒内,微丝以多聚体的形式存在(图版 I-2 箭头所指),且微丝与微丝结合蛋白结合形成了网状结构,充满了整个花粉粒(图版 I-2);而在两种不育的花粉粒内,正常的微丝结构被破坏,虽然其不育类型不同,败育的时期不同,但花粉粒内的微丝结构特征和位置分布的变化趋向却相似,除了 T 型不育花粉粒内的微丝含量较化学杂交剂诱导的不育花粉粒内的明显少外,其余均表现为微丝的网状结构解体,呈短棒状或颗粒状,集中于花粉粒中部,花粉粒周缘缺乏(图版 I-4, I-6)。阎隆飞^[12]的研究表明,小麦花粉的败育与组成微丝的基本单位肌动蛋白的含量有关。本研究的结果充分说明,小麦花粉的败育不仅与组成微丝的基本单位的含量有关,而且与微丝在细胞内存在的形式和结构有关。微丝的网状结构是由微丝(肌动蛋白纤丝)与微丝结合蛋白结合组装而成的,微丝与不同种类的微丝结合蛋白相互作用可以形成不同的微丝结构,在细胞中行使不同的功能,如维持细胞形状、参与细胞分裂及细胞与细胞器的运动定位、胞质环流、顶端生长和信号传导等^[8]。据此可以推测,微丝对花粉败育的影响,可能是由于不育系花粉中的微丝骨架被破坏,致使其不能有效调节各种细胞器的运动和定位,阻滞胞质环流,引起各代谢反应酶体系的功能紊乱,造成细胞代谢失调,从而导致花粉败育。

本试验仅是初步的,究竟微丝或细胞骨架系统是怎样影响花粉败育的,还有待于更为深入的研究。

[参考文献]

- [1] 陈军方,任正隆,孔秀英,等. 小麦中雄性不育同源序列的分离、鉴定及表达[J]. 遗传学报,2005,32(6):566—750.
- [2] Hanson M R. Plant mitochondrial mutations and male sterility[J]. Ann Rev Gent,1991,24:261—286.
- [3] 朱 宏,王继华,王同昌,等. 小麦 T 型细胞质雄性不育与可育系叶片蛋白质双向电泳分析[J]. 植物研究,2004,24(3):339—342.
- [4] Pruitt K D, Hanson M R. Transcription of petunia mitochondrial CMS-associated pcf locus in sterile and fertility-restored line[J]. Mol Genet,1991,227(3):348—355.
- [5] Yao Y Q, Zhang G S, Liu H W, et al. Cytomorphology and cytochemical localization of K-type and T-type Cytoplasmic male sterile pollen in wheat[J]. Agri Sci in china,2003,2(6):591—596.
- [6] 方正武,姚雅琴,张改生,等. GENESIS 诱导小麦雄性不育性与花药组织呼吸关系的初步研究[J]. 西北植物学报,2004,24(6):982—985.
- [7] 李素云,王永朝,刘惠敏,等. 细胞生物学实验指导[M]. 第 2 版. 北京:高等教育出版社,2001. 192.
- [8] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 第 2 版. 北京:高等教育出版社,2002. 319—356.
- [9] Condeelis J S. The identification of F-actin in the pollen tube and protoplast of amaryllis bellednna[J]. Exptl Cell Res,1974,88:435—439.
- [10] Pierson E S, Derksan J, Traas J A. Organization of microfilament and mictotube in pollen tube[J]. Eur J Cell Biol,1986,41:14—18.

- [11] 刘国琴, 阎隆飞. 花粉管微丝骨架的研究[J]. 实验生物学报, 1987, 20(3): 267-273.
[12] 阎隆飞, 刘国琴, 肖兴国. 从花粉肌动蛋白到作物雄性不育[J]. 科学通报, 1999, 44(23): 1-6.

Preliminary studies on relationship between the cytoskeleton and the male sterile lines of wheat

YAO Ya-Qin, LI Bei, ZHANG Ying-li, ZHANG Gai-sheng

(College of life Sciences, Northwest A & F, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The structural characteristics of the microfilaments were revealed in sterile pollens of CMS, CHA and mature fertile on wheat by Coomassie brilliant blue R250. The results indicated that mature fertile pollens were full of the reticular structure compositing by polymerized microfilaments, and that the reticular structure of microfilaments were disrupted and broke in two sterile pollens of CMS and CHA, then centralized in the middle part of the pollens, no distribution near outmargin of pollens. The microfilaments in pollen of CMS(T-type) were lower than those of CHA. The study provided new method and thoughts for research mechanism of pollen abortion on CMS and the function of cytoskeleton and the relationship between them in wheat pollens.

Key words: cytoskeleton; wheat; CMS; CHA

(上接第 38 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)12-0039-EA

Constructions of two DNA vaccines against chicken *E. tenella* and their expressions in chicken muscles

Gerileru, XU Li-xin, YAN Ruo-feng, LI Xiang-rui

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: The open reading frame of MZ5-7 gene, an antigen of *Eimeria tenella* second generation merozoites, was cloned into plasmid pcDNA4. 0 to construct DNA vaccine pcDNA4. 0-MZ. With the same methods, the mature interleukin 17 gene of chicken was cloned into downstream of the MZ5-7 gene to construct an immune regulatory DNA vaccine pcDNA4. 0-MZ-IL-17 co-expressive of MZ5-7 antigen and IL-17. After being purified, 50 μ g of these two DNA vaccines were used to immunize one-week-old chickens with breast muscle injection respectively. The transcriptions and expressions of the target genes were determined by RT-PCR and Western-blot respectively on the day 3, 5, 7, 15 and 20 post immunization. The results showed that the transcribed products of MZ5-7 gene was detectable from all injection site muscles immunized with two DNA vaccines respectively on day 5, 7 and 15 post immunization using RT-PCR. The expression proteins of two plasmids were respectively identified by Western-blot from all injection sites on day 5 and 7 post immunization. The molecular weight of expressive protein of pcDNA4. 0-MZ was 36 ku coincident with the predicted protein of the MZ5-7 gene while the molecular weight of expressive product of pcDNA4. 0-MZ-IL-17 was about 64 ku, slightly larger than that of predicted product of MZ5-7 gene plus IL-17 gene. No target products were detected in the no-injection sites immunized with any of the two DNA vaccines. The results indicated that these two DNA vaccines could be effectively expressed in chicken muscles when immunized by muscle injection.

Key words: *Eimeria tenella*; MZ5-7 gene; IL-17; DNA vaccine; chicken