

1997/90760X/025/005 ①

K 型小麦不育系花药壁细胞色素 氧化酶的分布

1-118
5512.103.5

姚雅琴¹ 张改生²

(1 西北农业大学实验中心, 2 农学系, 陕西杨凌 712100)

摘 要 用电镜细胞化学定位技术, 对 ms(Ae, kotschy)-77(2) 雄性不育花药及其保持系花药壁四层组织和维管组织细胞中的细胞色素氧化酶进行了定位和相对定量的研究。结果表明, 药壁中层、绒毡层细胞内细胞色素氧化酶的变化, 不育系与其保持系基本一致, 而药壁表皮、药室内壁和维管组织细胞内线粒体中的细胞色素氧化酶的含量明显低于其保持系。推测, 细胞色素氧化酶活性降低可能是导致花粉败育的重要因素之一。

关键词 小麦, 雄性不育, 细胞色素氧化酶, 超微结构

中图分类号 Q-336, S334

近年来, 随着分子生物学的发展, 限制性内切酶技术及细胞器 DNA 分离技术的应用, 人们越来越多地认为 mtDNA 与雄性不育密切相关。刘炎生^[1]以线粒体细胞色素氧化酶亚基 I、II (cox I、cox II) 基因为探针, 与不育系及其保持系的叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 酶切片段分别进行杂交, 发现叶绿体 DNA 没有该基因的同源顺序, 而线粒体 DNA 该基因在不育与可育之间存在组织结构的差异。沈银柱^[2], 黄铁城^[3]生化分析表明, 不育植株细胞色素氧化酶的含量明显低于其保持系。作者在前人研究的基础上, 以 ms(Ae, kotschy)-77(2) 小麦雄性不育系及其保持系为材料, 用电镜细胞化学定位技术, 对被普遍认为与细胞质雄性不育密切相关的线粒体基因 cox I、cox II 编码部分亚基, 并具重要生理功能的细胞色素氧化酶进行定位和相对活力研究, 将生理生化功能与超微结构结合起来, 从细胞色素氧化酶分布及超微结构变化的角度, 探讨其功能与雄性不育的关系。

1 材料与方法

材料为 K-77(2)A 和 K-77(2)B 花药, 采自西北农业大学小麦研究所杨天章教授试验地。按文献[4]方法取样后, 固定在 0.5% 戊二醛与 2% 多聚甲醛混合固定液中 20 min, 0.1 mol/L PBS(磷酸缓冲液)漂洗, 在含有 0.1 g/L 过氧化氢酶的 PBS 预浮液中 37℃ 下预浮育 10 min, PBS 漂洗, 再放入包含 3,3'-二氨基联苯胺(简称 DAB) 0.1 g/L, 过氧化氢酶 1 g/L, 细胞色素 C 1 g/L, PBS 0.1 mol/L 的浮育介质中 37℃ 下浮育 1 h。同时, 将另一部分花药浸入含有 0.1 mmol/L KCN 的浮育介质中, 在相同条件下, 浮育相同的时间作为对照。然后将所有样品在 PBS 中过夜, 按照常规进行后固定、脱水、渗透、包埋和切片, 100CX-Ⅱ 透射电子显微镜下观察拍照。

收稿日期 1997-03-10

课题来源 陕西省自然科学基金资助项目

作者简介 姚雅琴, 女, 1957 年生, 高级实验师, 硕士

2 结果与分析

DAB 与线粒体膜上的细胞色素氧化酶反应,被氧化聚合形成不溶性吩嗪聚合物沉积在线粒体嵴膜上,该聚合物又与四氧化钨作用形成嗜钨性 DAB 氧化聚合物,电镜下通过观察嗜钨性 DAB 氧化聚合物的分布来确定细胞色素氧化酶的位置,KCN 能够抑制这一过程的进行。本实验用含有 0.1 mmol/L KCN 的 DAB 浮育液处理的对照花药中,没有发现嗜钨性 DAB 氧化聚合物的存在(图版 I-1),而用未加 KCN 的 DAB 浮育液处理的同样花药中却发现程度不同的嗜钨性 DAB 氧化聚合物分布,且雄性不育花药与其保持系花药中不同,同一花药不同的发育时期也不同,该嗜钨性 DAB 氧化聚合物均分布在线粒体内嵴膜上(图版 I-2)。

2.1 保持系花药药壁组织内细胞色素氧化酶的分布

本实验观察了药壁四层组织(药壁表皮、药室内壁、中层、绒毡层)和花药维管组织细胞内细胞色素氧化酶活性分布。在小孢子母细胞和四分体时期,绒毡层、中层细胞中线粒体内嵴膜上有嗜钨性 DAB 氧化聚合物分布。四分体以后,随着中层、绒毡层细胞的逐渐解体,线粒体膜破裂,嵴消失,嗜钨性 DAB 氧化聚合物也消失。药壁表皮、药室内壁细胞在小孢子母细胞和四分体时期,细胞内具发育初期的线粒体,无嵴,也无嗜钨性 DAB 氧化聚合物沉积(图版 I-3)。自由小孢子时期,随着线粒体的发育成熟,线粒体内嵴由无到有,由少到多,嵴膜上沉积的嗜钨性 DAB 氧化聚合物也逐渐增多(图版 I-4, I-5),到单核花粉后期和二核期,线粒体嵴发达,内外膜清晰,质浓,线粒体活性达到最旺盛时期,线粒体内嵴膜上沉积有大量的嗜钨性 DAB 氧化聚合物(图版 I-6, 图版 I-1),但也有少量线粒体内没有嗜钨性聚合物沉积。这时,花药药隔维管细胞内充满了线粒体,该线粒体具丰富的嵴,嵴膜上沉积有大量的嗜钨性 DAB 氧化聚合物(图版 I-2)。

2.2 不育系花药药壁组织内细胞色素氧化酶的分布

中层、绒毡层细胞中的细胞色素氧化酶活性变化与保持系基本相同。药壁表皮、药室内壁、花药维管细胞中的细胞色素氧化酶活性却明显低于其保持系。在小孢子母细胞和四分体时期,药壁表皮、药室内壁细胞内,含有比保持系少的初级线粒体,线粒体中无嵴,也没有嗜钨性 DAB 氧化聚合物沉积。自由小孢子时期,不育花药药壁表皮、药室内壁细胞中,线粒体内嵴膜上几乎没有嗜钨性 DAB 氧化聚合物沉积(图版 I-3)。单核靠边期到二核期,药壁表皮、药室内壁细胞中,线粒体数目较保持系的少,活性降低,线粒体嵴少,不发达,有部分线粒体内嵴膜膨胀,破裂,空泡化进而消失。线粒体内嵴膜上累积比保持系少得多的嗜钨性 DAB 氧化聚合物(图版 I-4, I-5, I-6)。花药维管细胞中,含有比其保持系少得多的线粒体,线粒体嵴膜也沉积比其保持系少得多的嗜钨性 DAB 氧化聚合物(图版 I-7)。

3 讨 论

作者以前的研究表明,小麦药壁表皮和药室内壁细胞在单核后期和二核期,细胞内原生质剧增,活性较前期明显增强,细胞器(例如线粒体、内质网、高尔基体、核糖体等)不仅在数量上大增,而且在结构功能方面发达活跃。药室内壁中的叶绿体,基质片层与基粒片

层丰富,结构发达,这些都表明此时药壁表皮、药室内壁细胞处于代谢活动旺期^[4]。郭洁用 3H-尿苷和 3H-亮氨酸标记甜菊花药,结果表明,在单核后期药室内壁细胞中 DNA 和蛋白质合成突然增加^[5]。同时在这个时期,作者在药壁表皮细胞内,看到了几乎充满整个细胞的脂质小球。在药室内壁细胞中,花粉囊内,乌氏体,绒毡层膜,花粉粒周围看到了与此相似的颗粒。因此,作者提出了在绒毡层解体后,药壁表皮、药室内壁细胞具有合成与供应花粉后期发育所需营养物质的功能^[4]。本研究进一步支持了这一观点。四分体时期以前,药壁表皮、药室内壁细胞内的线粒体处于发育初期,线粒体内无嵴或者仅有少量不发达的嵴,线粒体内没有或仅有极少量具活性的细胞色素氧化酶分布在不发达的内嵴膜上。从自由小孢子时期开始,随着线粒体发育成熟,线粒体内嵴增多,细胞色素氧化酶的活性增强,到单核后期和二核期,线粒体衬质空间布满内嵴,内嵴膜上布满具活性的细胞色素氧化酶,这时该酶的活性达到最高。细胞色素氧化酶是细胞色素 a 和 a₃ 横跨线粒体的内嵴膜,将电子直接传递给分子氧的末端氧化酶,是线粒体的标志酶之一。线粒体内细胞色素氧化酶活性增高,表明线粒体的转能活性提高,使得 ATP 水平与能荷值增大。药壁表皮、药室内壁细胞内,产生足够的能量促使旺盛的代谢活动和进行大量的生物合成,以便提供花粉后期发育所需的物质与能量。

细胞色素氧化酶活性的高低与细胞质雄性不育密切相关。不育系花药药壁中层、绒毡层细胞内,由于具有与其保持系几乎相同的细胞色素氧化酶活性分布,所以该细胞发育与代谢基本正常,提供了小孢子前期发育所需的物质与能量,使其小孢子前期发育基本正常。而在绒毡层解体后,药壁表皮、药室内壁细胞内,细胞色素氧化酶的活性大大低于其保持系,甚至有少数不育花药该细胞中几乎没有具活性的细胞色素氧化酶存在,使其线粒体不能提供细胞正常发育所需的能量;加之药隔维管细胞内细胞色素氧化酶活性低,线粒体少,影响对该细胞养分的供应,致使药壁表皮、药室内壁细胞的正常发育受到抑制,不能满足对花粉粒发育所需的物质与营养的供应,花粉粒由于得不到正常发育所需的物质与营养而败育。因此,认为细胞色素氧化酶活性降低可能是导致花粉败育的重要因素之一。

参 考 文 献

- 1 刘炎生,汪训明. 水稻细胞质雄性不育系和保持系的线粒体 *cox I*, *cox II* 基因组差异分析. 遗传学报, 1988, 15(5): 348~354
- 2 沈银柱. 普通小麦不同细胞质雄性不育系及保持系萌动胚和幼芽同工酶的初步分析. 河北师范大学学报, 1989, (3): 81~86
- 3 黄铁城. 杂种小麦研究—进展, 问题与展望. 北京: 北京农业出版社, 1990
- 4 姚雅琴, 杨天章. 小麦药壁表皮细胞与药室内壁细胞超微结构. 西北农业大学学报, 1996, 24(4): 39~45
- 5 郭 洁, 陈睦传, 汪德耀. 甜菊花药壁的超微结构及功能研究. 实验生物学报, 1989, 22(3): 270~277
- 6 Baidulova-Bako T Y. Protein and multiple molecular forms of enzymes in anthers of wheat with cytoplasmic male sterility. PBA, 1986, 56: 820
- 7 Peter G, Vlslerie P. The maize cytochrome C oxidase subunit I gene: Sequence, expression and rearrangement in cytoplasmic male sterile plants. The EMBO J., 1985, 4(7): 1617~1623
- 8 Rathburn H B, Hedgecoth C. A chimeric open reading frame in the 5' flanking region of *cox I* mitochondrial DNA from cytoplasmic male sterile wheat. Plant Mol. Bio., 1991, 16: 909~912



图版 I

M. 线粒体; Ch. 叶绿体; E. 药壁表皮; En. 药室内壁。下同。

1. KCN 抑制剂处理后, 线粒体内嵴膜上没有 DAB 氧化聚合物(简称聚合物)沉积, $\times 19000$; 2. DAB 细胞化学定位标记的线粒体内嵴膜上有聚合物沉积, $\times 29000$; 3. 四分体时期药室内壁细胞内具初级线粒体, 线粒体内无嵴也无聚合物沉积, $\times 14000$; 4. 自由小孢子时期药壁表皮细胞内具少量含聚合物的线粒体, $\times 10000$; 5. 77(2)B 自由小孢子时期药室内壁细胞内线粒体嵴膜上有聚合物沉积, $\times 7200$; 6. 77(2)B 单核靠边期药壁表皮细胞内具丰富的线粒体, 线粒体嵴膜上沉积大量的聚合物, $\times 14000$ 。



图版 I

1. 77(2)B 单核靠边期药室内壁细胞具丰富的内嵴膜上沉积大量的聚合物的线粒体, $\times 19000$; 2. 77(2)B 花药维管细胞具极丰富的内嵴膜上沉积大量的聚合物的线粒体, $\times 5800$; 3. K-77(2)A 自由小孢子时期药壁表皮、药室内壁细胞, 线粒体内嵴膜上几乎没有聚合物沉积, $\times 7200$; 4. K-77(2)A 单核靠边期药室内壁细胞内部分线粒体膜破裂, 内嵴膜上几乎没有聚合物沉积, $\times 14000$; 5. K-77(2)A 单核靠边期药壁表皮细胞内部分线粒体内嵴膨胀, 内嵴膜上几乎没有聚合物沉积, $\times 14000$; 6. K-77(2)A 单核靠边期药室内壁细胞内部分线粒体膨胀, 空泡化, 内嵴膜上几乎没有聚合物沉积, $\times 19000$; 7. K-77(2)A 花药维管细胞内线粒体嵴膜上沉积有比 77(2)B 少得多的聚合物, $\times 10000$.

Cytochrome Oxidase Distribution of Anther Wall Cells from Male Sterile Line

Yao Yaqin¹ Zhang Gaisheng²

(1 The Central laboratory, 2 Department of Agronomy, Northwestern Agricultural University, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract The results obtained by the cytochemical localization of cytochrome oxidase activity reaction indicate that reaction products of cytochrome oxidase activity in tapetal and middle-layer cells of anther wall from male sterile line, K-77(2)A, were similar to those from its maintainer line, 77(2)B, but the reaction products in pidermis and endothecium cells of anther wall and in the vascular cells of anther from K77(2)A were far lower than those in 77(2)B. It is supposed that reduction oxidase activity was one of the causes resulting in wheat pollon abortion.

Key words wheat, male sterile, cytochrome oxidase, ultrastructure

《授时通考校注》荣获陕西省人文、社科优秀成果一等奖

由西北农业大学古农学研究室马宗申研究员校注、姜义安参校的《授时通考校注》经 10 余年努力方告完成。对这一重要成果国家教委和农业部拨款资助出版,并荣获陕西省教委 1997 年度人文、社会科学研究优秀成果一等奖。

《授时通考》一书最早出版于清乾隆七年(1742 年),是一部集体官修的大型综合性农书,也是我国历史上最后一部集传统农学大成的农书。

《授时通考》共有校记 1094 条,注释 4373 条,工作浩繁,校勘精审,注释简明易懂,查错补漏,匡谬正误,对开展农史学研究,弘扬祖国优秀传统文化具有重要意义。

(罗永娟 供稿)