

不同化学杂交剂(CHA)对小麦花药同工酶影响的研究^①

沈银柱, 刘植义, 黄占景, 何聪芬, 柏峰, 马闻师, 朱正歌, 葛荣朝

(河北师范大学生物系, 河北 石家庄 050016)

许顺芝, 岳聚兴, 张中良

(石家庄市栾城原种场, 河北 栾城 051430)

摘要: 在小麦叶枕距 ± 2 cm时, 喷施4种不同化学杂交剂(CHA)后, 分别取小孢子处于不同发育阶段的花药, 进行过氧化酶(POD)、淀粉酶(Amy)和酯酶(Est)等同工酶的分析。研究表明: 在小孢子母细胞减数分裂期, 处理2、3和4三种CHA对POD的A₁、A₂; B₂、B₄和B₅; C₁、C₂和C₃同工酶带的活性均有明显的抑制作用; 处理5除去对A₁和A₂表现抑制外, 对其他酶带的活性均有增强作用。在单核早期, 处理2和3的A、B和C区POD同工酶活性均明显低于对照; 处理4和5上述各区POD同工酶活性却明显高于对照。在上述两个发育时期, 处理2对Amy¹区酶活性有增强作用, 而处理3、4和5对该区酶活性却表现了专一性的抑制。各处理对Est同工酶A区和B区的酶活性主要表现为抑制。实验结果表明, 不同的CHA均通过干扰花药的物质和能量代谢而导致雄性生理性不育。

关键词: 小麦; 化学杂交剂; 同工酶; 雄性生理性不育

中图分类号: Q37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9772(1999)05-0041-46

A Study of Effect on Different CHA to Wheat Anther Isoenzymes

SHEN Yin-zhu, LIU Zhi-yi, HUANG Zhan-jing, HE Cong-fen,

BAI Feng, MA Wen-shi, ZHU Zheng-ge, GE Rong-chao

(Department of Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016 China)

XU Shun-zhi, YUE Ju-xing, ZHANG Zhong-liang

(Original Seed Farm of Luancheng County, Luancheng 051430 China)

Abstract: When the distance between wheat (*T. aestivum*) flag leaf and its adjucent leaf is about ± 2 cm, four different kinds of CHA (Chemical Hybridizing Agents) were sprayed, then we took the anthers which were at different microspore's development stages to make POD, Amy and Est isoenzymes analysis. The study showed that: during the microsporocyte meiosis, treatment 2, 3 and 4, the three kinds of CHAs had evident inhibition on the activity of POD's bands A₁, A₂; bands B₂, B₄ and B₅; bands C₁, C₂ and C₃. CHA of treatment 5 had inhibition on bands A₁ and A₂, but could promote the activity of the other POD bands. During the early uninucleate stage, the POD activity on area A, area B and area C with CHAs of treatment 2, 3 was obviously lower than the control. But in these areas POD activity with CHAs of treatment 4, 5 was obviously higher than the control. During the above two development

①收稿日期: 1998-03-24; 修订日期: 1998-07-01

基金项目: 国家“八五”攻关子课题(85-002-02-05), 河北省重大科技攻关课题资助项目

致谢: 本文承首都师范大学郭平仲教授审阅并提出宝贵意见, 在此表示谢意

作者简介: 沈银柱(1939-), 男, 河北石家庄人, 教授, 专业方向: 植物遗传学。

stages, CHA of treatment 2 obviously strengthened the activity of Amy¹ area; on the other hand, CHAs of treatment 3, 4 and 5 have the unique inhibition in the same area. All the treatments mainly had inhibitant effects on the activities of Est's area A and area B. The study shows that all the different CHAs bring about male physiological sterility. Through disturbing the anther's metabolism of substances and energy.

Key words: Wheat; CHA; Isoenzyme; Mele physiological; Sterility

采用化学杂交剂(chemical hybridizing agent, CHA)进行小麦化学杂交制种是当前利用小麦杂种优势的主要途径之一。由国外引进的化学杂交剂一般成本较高,制种基地的农民较难承受,在一定程度上影响了杂交小麦的推广。河北省小麦杂种优势利用研究协作组自1980年以来,立足国内,7年间先后选用60余种配方,经100多个品种(系)反复鉴定,筛选出冀化2号化杂改进剂,在1995年6月获国家专利局颁发的“发明专利证书”,并选配出比对照品种增产20%~30%,产量可达9000公斤/公顷的杂交小麦新组合,在大面积生产应用上迈出了可喜的一步。关于乙烯利和KMS-1(均三嗪二酮)诱导小麦雄性不育的生理效应和细胞化学方面的研究已有报道^(1~3)。1994年,我们用几种不同CHA和冀化2号对小麦花药同工酶的影响作了比较研究,从基因表达的角度出发探讨了CHA诱导小麦雄性不育的生化机制。现报道如下。

1 材料和方 法

供试材料为普通小麦(*Triticum aestivum*)品种繁91,由河北省粮油作物研究所小麦杂优室刘福昌提供。试验分5个处理,处理1为清水,处理2~5所喷药液依次为:7000×10⁻⁶ 乙烯利(简称E);7000×10⁻⁶ KMS-1(均三嗪二酮,简称K);EK(4000×10⁻⁶ 乙烯利+3000×10⁻⁶ KMS-1的混合药液);冀化2号(EK+1×10⁻⁶ 三十烷醇)。以处理1为对照。各处理均在小麦叶枕距±2cm时喷药,然后分别在喷药后第4、8和12天时取样,依次镜检选取处于减数分裂期、单核早期和双核期的花药,按样品与提取液1:3的比例加入提取液(0.01 mol 柠檬酸、0.065 mol Tris, pH8.2),在冰浴条件下研磨制样,经冰冻离心5000 r/min 30分钟,取上清液分别加入等体积的10%甘油,分装在小离心管内,0℃冰箱保存备用。

采用聚丙烯酰胺凝胶板状电泳分析过氧化物酶(POD)、淀粉酶(Amy)和酯酶(Est)同工酶。分析POD时采用Tris-HCL系统, pH8.9;浓缩胶T=4%,分离胶T=9%,电极缓冲液为高离子浓度的Tris-甘氨酸系统, pH8.3。分析Amy和Est时,采用Tris-Citric acid系统, pH8.9,浓缩胶=4%,分离胶浓度前者为7.5%,后者为10%,电极缓冲液为低离子浓度的Tris-甘氨酸系统 pH8.7。电泳时均采用稳压的方法,开始加压到110V,待前沿到达浓缩胶和分离胶的交界面时,将电压升高到220V,直到电泳结束时为止。剥离出凝胶板,POD同工酶参照李继耕、杨太兴⁽⁴⁾的方法染色;Amy同工酶参照胡能书⁽⁵⁾的方法染色;Est同工酶参照Smithies⁽⁶⁾的方法染色,略加改动。漂洗后及时拍照、测计泳动距离,求出各酶带的迁移率(Rf值)进行分析。

2 结 果 与 讨 论

2.1 过氧化物酶(POD)同工酶

各处理小孢子母细胞减数分裂期和单核早期、双核期花药POD酶谱的变化见图1。为叙述方便,按文献〔7〕将酶带由正极到负极分为A、B和C3个区。结果表明,减数分裂期在处理2、3和4中,C₁、C₂和C₃;B₂、B₃、B₄和B₅;A₁和A₂同工酶带活性比对照明显下降。说明4000×10⁻⁶或更高浓度乙烯利对POD的活性有显著的抑制作用。这与代尧仁等用乙烯利处理水稻花药,发现乙烯利浓度超过15×10⁻⁶时,随乙烯利浓度的增加POD活性下降的事实相一致⁽⁸⁾。在单独喷施7000×10⁻⁶ KMS-1的处理3中,A区的A₁同工酶带完全缺失(图1);而在含有3000×10⁻⁶ KMS-1的处理4和5中,该同工酶带活性虽然明显减弱,但仍有表达。说明高浓度的KMS-1对A₁同工酶带有关基因的表达起到了阻抑的作用。

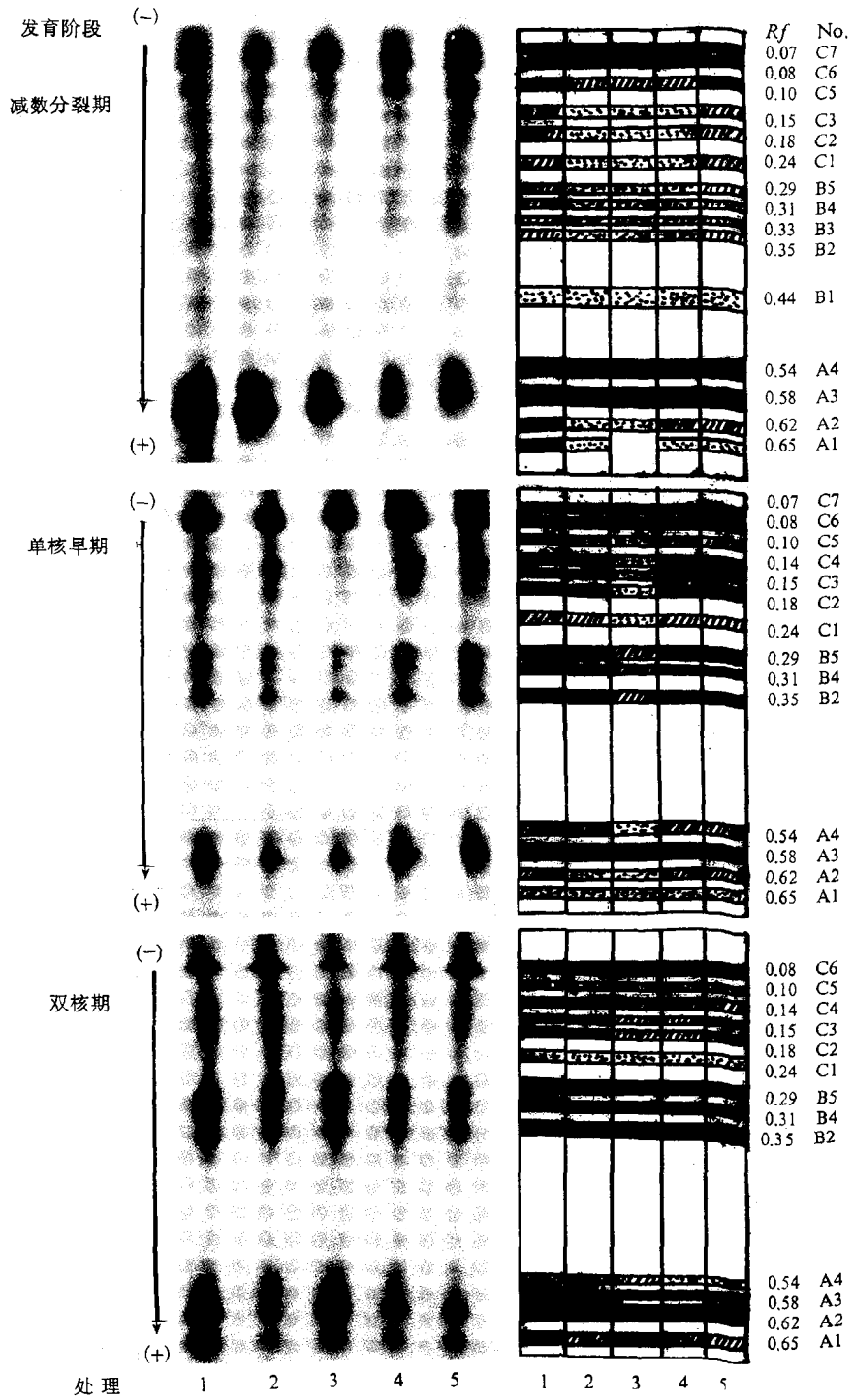


图1 不同发育时期花药过氧化物酶同工酶图谱

处理 1. 清水; 2. $7\ 000 \times 10^6$ 乙烯利; 3. $7\ 000 \times 10^6$ KMS-1; 4. $4\ 000 \times 10^6$ 乙烯利+ $3\ 000 \times 10^6$ KMS-1;
5. 冀化2号($4\ 000 \times 10^6$ 乙烯利+ $3\ 000 \times 10^6$ KMS-1+三十烷醇).

此外, A_2 同工酶带的活性与其他处理相同也成下降趋势。但在加有生长调节剂三十烷醇的处理 5 中, 其余同工酶带活性与对照处理 1 相比有增强的趋势。这可能与三十烷醇是一种高生物活性的生长调节剂有关^[9]。

单核早期, 在处理 2 和处理 3 中 POD 酶谱的变化, 主要表现为 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 ; 以及处理 3 中 B_4 、 B_5 和 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 同工酶带活性明显地低于同期对照。显然是单独使用 $7\ 000 \times 10^{-6}$ 乙烯利或 $7\ 000 \times 10^{-6}$ KMS-1 对上述同工酶有关基因表达阻抑的结果。这与刘忠松^[10] 利用高浓度化学药物诱导甘蓝型油菜雄性不育研究中发现的现象相一致。但本研究的处理 4 与处理 5 中, POD 同工酶 C_2 、 C_3 、 C_4 和 C_5 ; B_2 、 B_4 和 B_5 及 A_3 同工酶带活性明显强于对照(图 1)。可见在单核早期, 这一小孢子发育的关键时期, POD 部分同工酶活性的过度增强可能同样也是导致雄性生理性不育的原因之一。

双核期, 各处理酶活性与同期对照相比大部分明显减弱, 主要集中在 A 区和 C 区, 其次是 B 区(图 1), 此时镜检花粉大部分已败育^[11]。正如代尧仁^[8] 所述, 花药中剩下的主要是药壁细胞, 因此, 其呼吸酶活性的显著下降是意料之中的。

上述结果表明, 不同 CHA(含冀化 2 号)对小麦花药 POD 同工酶的影响, 在减数分裂期均表现为对 A_1 、 A_2 同工酶活性的抑制; 在单核早期处理 2 和 3 对 A、B、C 区的同工酶活性也表现了抑制, 这种共有的规律说明这些酶带可能与小孢子的育性相关, 其中 A_1 和 A_2 两个同工酶或许显得更为重要。而冀化 2 号化杀剂对 A_1 、 A_2 之外的同工酶带却有增强作用。据文献报道, POD 是植物体内极活跃的一种酶, 在植物的呼吸作用中占有重要位置, 同时它可以参与植物体内生长素的代谢, 对植物的形态建成、生长及分化等生理现象都有一定的作用^[7]。可见小麦适期喷施 CHA, 干扰了植株基因的正常表达, 有关基因活性的抑制或超表达均可造成代谢失调, 影响能量的供求平衡, 从而导致雄性生理性不育。

2.2 淀粉酶同工酶(Amy)

按照文献^[5], 将淀粉酶同工酶区带靠近负极一侧的称为 Amy^2 区, 靠近正极一侧的称为 Amy^1 区。本研究 Amy 酶谱的变化主要表现在 Amy^1 区。

表 1 各处理不同发育时期花药 Amy 同工酶谱变化

区	Amy^1 区														
	0.44					0.46					0.53				
Rf	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
减数分裂期	+	+	0	+	+	++	++	0	+	+	+++	+++	+	++	++
单核早期	+	+	0	++	++	++	++	0	++	++	+++	++++	++	++	+++
双核期	0	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	++++	++	++	+++

注: +, ++, +++ 表示酶带着色程度。0 表示缺少相应酶带。

据文献〔5〕报道, 淀粉酶二聚物的合成受同一遗传位点的两个共显性等位基因(Amy^{1A} 、 Amy^{1B})的控制。本研究的结果(图 2)表明, 这两个共显性等位基因对 KMS-1 的敏感性, 反映在它们控制的 Rf 值为 0.44、0.46 和 0.53 三个同工酶活性的规律性变化上。其中 Amy^{1B} 基因纯合时控制的 0.44 和 Amy^{1A} 、 Amy^{1B} 基因呈杂合状态时控制的 Rf 0.46 同工酶带, 在减数分裂期, KMS-1 用药浓度达到 $7\ 000 \times 10^{-6}$ 的处理 3 中, 这两个酶带均被抑制, 破坏了基因表达的时空性。而 Amy^{1A} 基因纯合时控制的 Rf 0.53 同工酶带却能微弱表达, 说明其纯合时对 KMS-1 的敏感性较差。上述实验结果显然与 KMS-1 对这两个基因的专一性抑制有关。当 KMS-1 的浓度减小为 $3\ 000 \times 10^{-6}$ 时(处理 4), 上述 0.44、0.46 同工酶带稍有活性, Rf 0.53 同工酶带的活性略有增强。这种规律性变化也反映在 CHA 配方与处理 4 相同, 仅另外添加少量生长调节物质三十烷醇的处理 5(冀化二号)中(图 2, 表 1)。

单核早期, 处理 3 中 Rf 值为 0.44、0.46 的同工酶带仍然缺失(图 2), Rf 值为 0.53 的同工酶带活性随着时间的推移有所增强, 但仍不及其他处理, 可见高浓度 KMS-1 的抑制作用可以持续到单核早期。同期的处理 4 和 5, 上述三个同工酶带的活性随着小孢子的发育进程, 或因 KMS-1 施用浓度较低($3\ 000 \times 10^{-6}$), 或因 CHA 中加有少量

三十烷醇, 而恢复到对照水平(图 2)。双核期处理 3 中, R_f 值为 0.44 和 0.46 同工酶带的活性也因 KMS-1 药效的逐渐消失而得到恢复, R_f 0.53 同工酶带的活性也随之明显增强(图 2, 表 1)。由此不难看出有关基因延迟表达的直接原因之一是 KMS-1 作用的结果。

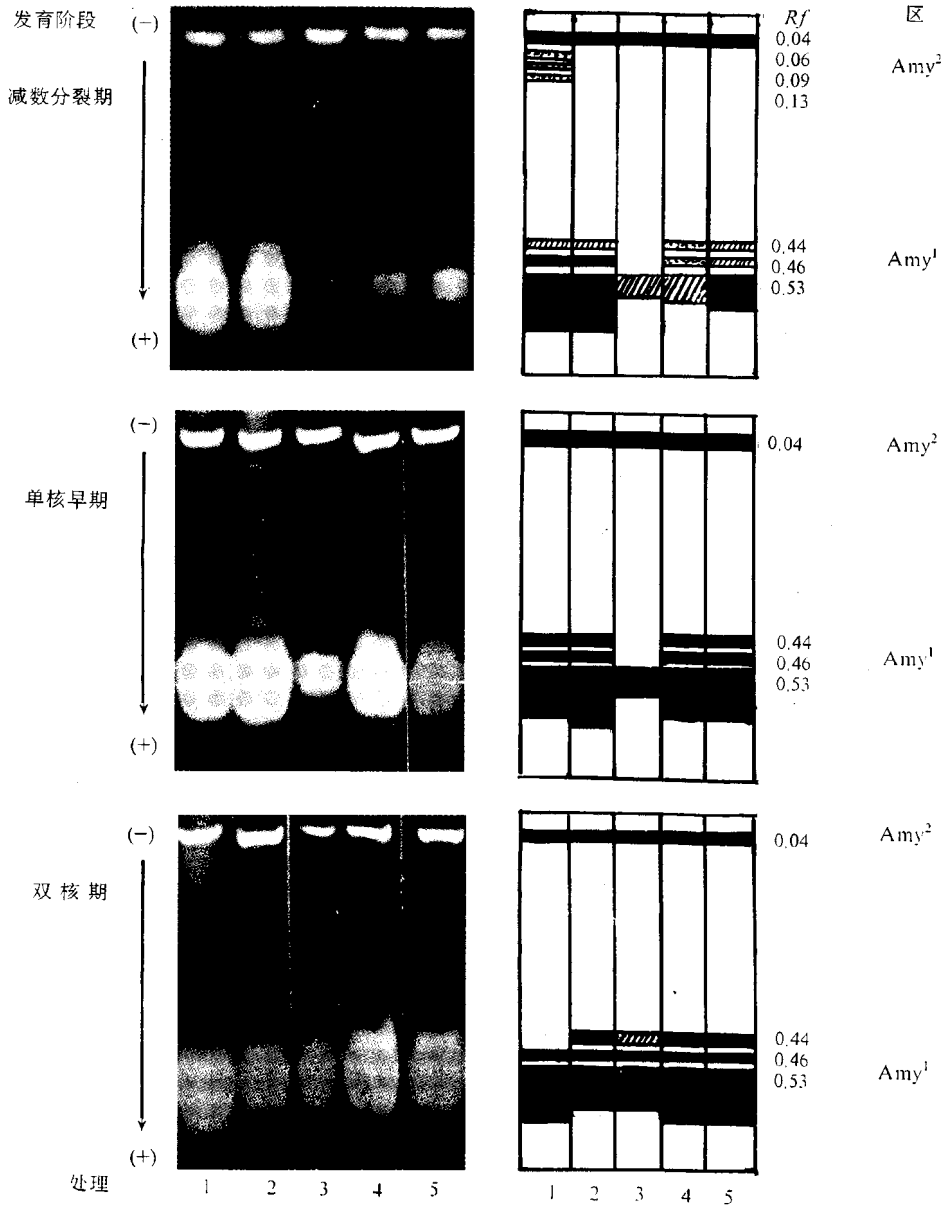


图 2 不同发育时期花药淀粉酶同工酶酶谱(处理代号同图 1)

单独喷施乙烯利的处理 2, 在减数分裂期 R_f 0.53 同工酶带的活性比同期对照略有减弱, 进入单核早期其活性明显高于对照, 就 Amy 同工酶的总量而言, 此期也十分显著地超过了对照(图 2, 表 1), 这可能是乙烯利诱导的雄性不育株花粉粒淀粉不能积累的直接原因。按照正常的基因表达程序, 双核期 Amy¹ 区 R_f 0.44 同工酶带应消失(图

2, 表 1)。但喷施 CHA 的各处理, 在此期却有该酶带的存在, 似乎双核期这一酶带有可能作为雄性不育株淀粉酶同工酶的特征酶带。再次说明 CHA 可以破坏基因表达的时空性, 最终导致雄性生理性不育。

2.3 酯酶同工酶(Est)

纵观各期酯酶同工酶酶谱的变化, 在酶带数目上无明显不同, 只是存在活性上的差异, 主要集中在单核早期(图 3)。结果表明, 不同 CHA 使各区酶带的活性均明显低于对照。处理 3、4 和 5 的 A 区和 B 区各酶带活性都表现了这种趋势, 特别是处理 2 更为明显。文献^[5]报道, 酯酶是催化酯类化合物水解的酶类, 与植物的物质能量代谢有关。上述酶带活性的降低显然是有关基因的表达被 CHA 抑制的结果。

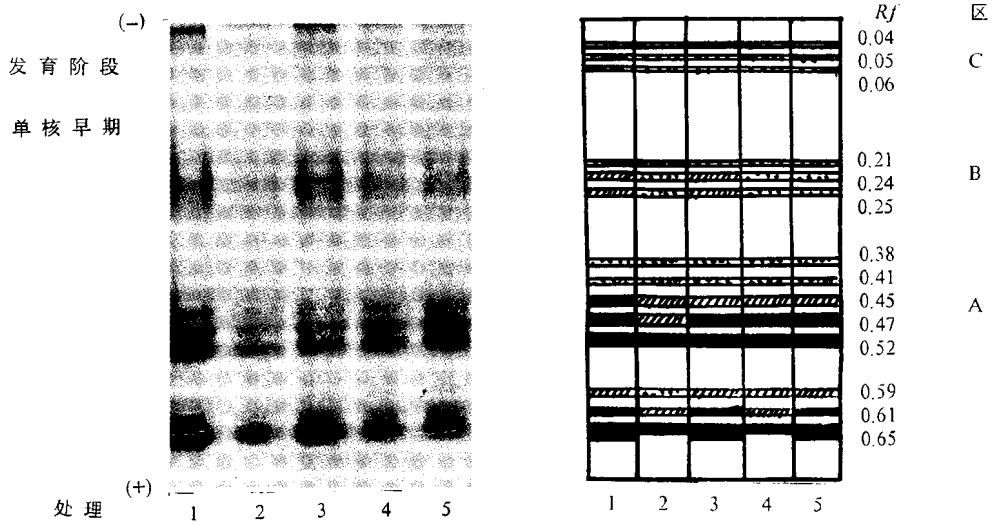


图 3 单核早期花药酯酶同工酶酶谱(处理代号同图 1)

不同 CHA 对小麦花药同工酶影响的动态变化表明, 它们的有效作用时间集中在减数分裂期和单核早期, 这正是田间施药的关键期; 它们的作用方式均在于通过干扰基因的正常表达程序, 进而扰乱物质能量代谢, 最终导致雄性生理性不育。研究这一动态变化, 可以指导利用 CHA 配制小麦杂交种的实践, 也可为研制新型高效 CHA 提供依据。

参 考 文 献:

- (1) 谢学民, 张全德, 朱汉如. 小麦杂种优势的研究与利用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981, 132~143.
- (2) 赵杏章, 黄纯农. KMS-1诱导小麦雄性不育的生理效应[J]. 植物生理学通讯, 1983, (5), 27~30.
- (3) Rowell P L, Miller D G. Induction of male sterility in wheat with α -chloroethylphosphonic acid (Ethrel)[J]. Crop Sci., 1971, 11(5): 629~631.
- (4) 李继耕, 杨太兴, 曾孟潜. 同工酶与玉米杂种优势研究 I. 营养生长期杂种与其亲本的比较[J]. 遗传, 1979, 1(3): 8~11.
- (5) 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985, 96~104, 112~116.
- (6) Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults[J]. Biochemical Journal., 1955, 61: 629.
- (7) 沈银柱, 周金树, 刘植义, 等. 玉米花药培养中不同激素对同工酶条带影响的研究[J]. 遗传, 1981, 3(2): 27~30.
- (8) 代尧仁, 孙振荣, 徐月荣, 等. 水稻二九南一号雄性不育系及相应保持系花药中某些呼吸酶和游离组蛋白的比较研究[J]. 遗传学报, 1978, 5(3): 227~234.
- (9) 陈善坤, 刘国屏, 潘晓云, 等. 三十烷醇胶体试剂和乳剂对水稻生理和产量效应的对比试验[J]. 植物生理学通讯, 1983, (6): 26~28.
- (10) 刘忠松. 不育花药生理生化研究进展与展望[J]. 植物生理学通讯, 1987, (2): 16~21.
- (11) 沈银柱, 刘植义, 张召泽, 等. 生长调节剂对CHA杀雄效果影响的研究[C]. 见: 杂种小麦研究进展. 北京: 农业出版社, 1993, 144~148.