

水稻雄性不育系花药微量热分析*

魏磊¹ 丁毅^{1**} 刘义² 余金洪¹

(1. 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 武汉大学化学与环境科学学院化学系热化室, 武汉 430072)

摘要: 采用 LKB2277 生物活性检测器, 对核-质互作雄性不育水稻不育系紫稻 A、野败型不育系珍汕 97A、红莲型不育系红莲粤泰 A 和马协型不育系马协 A 等 4 个不育系以及 1 个保持系紫稻 B 的花药进行了 37 条件下等温呼吸曲线的测定。微量热分析结果表明, 每一不育系都具有—特征曲线, 等温曲线的幅度高低和走势与花药中花粉粒的败育程度呈正相关, 这与我们的细胞学观察结果相一致。以紫稻 A 败育最彻底, 其呼吸曲线幅度最低, 能量代谢最不活跃; 余者呼吸曲线幅度递增, 依次为珍汕 97A、马协 A 和红莲粤泰 A, 最后为紫稻保持系 B。

关键词: 微量热分析; 水稻雄性不育; 花药; 花粉败育; 等温曲线

中图分类号: Q947.5; S511

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2002) 04-0308-03

Microcalorimetric Analysis of Anthers of Male Sterile Rice Sterile Line

WEI Lei¹, DING Yi^{1**}, LIU Yi², YU Jin-Hong¹

(1. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. College of Chemistry and Environment Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Using the LKB-2277 bioactivity monitor, five iso-thermal curves of anthers including four rice CMS(cytoplasm male sterile) lines Purple rice A, Zhenshan 97 A, Honglian Yuetai A and Maxie A and one maintainer Purple rice B were obtained at 37 . The results indicated that every curve had its character which was directly correlative to the degree of pollen abortion and consistent with the cytologic analysis, eg., the numerical value of Purple rice A anther's curve is minimum and the anther's metabolize activity is the weakest correspondingly, and so are the others. This is a new method that can be used in qualitative and quantitative analysis of rice male sterility.

Key words: Microcalorimetric analysis; Rice; Male sterile; Anther; Pollen abortion; Isothermal curve

杂交水稻在我国广泛推广栽培, 为我国的粮食生产做出了巨大的贡献。雄性不育是生产杂交种子的基础^[1], 而雄性不育系花粉败育是否彻底直接决定了杂交种子是否纯净, 可能影响农作物的产量。目前, 对于雄性不育系的研究大多采用细胞学鉴别、mRNA 的差别显示、线粒体 DNA 分析^[2,3]等方法。

在细胞学鉴别中, 由于受取材时期的限制, 工作量大, 费时费力, 而分子生物学研究既费时又受实验室条件的限制; 但使用生物活性检测器进行的微量热法分析以其高灵敏度以及可重复性在水稻雄性不育研究中显示出独特的作用。生物活性检测器可以在不损伤生物材料的条件下对生物系统进行静态(恒

收稿日期: 2001-12-28, 修回日期: 2002-03-26。

* 基金项目: 湖北省自然科学基金(批准号: 2000J111)重点资助项目和教育部骨干教师资助项目。

作者简介: 魏磊(1976-), 男, 硕士研究生, 从事植物分子细胞遗传学研究。

** 通讯作者。E-mail: yiding@whu.edu.cn

温式的)连续测定,可从生态系统 组织和器官 细胞 细胞器 生物大分子 生物小分子等不同结构层次和水平进行研究。目前已有报道,利用微量热法对细菌进行鉴别^[4,5]、测定细菌的生长热谱^[6]、研究酶和蛋白质等生物大分子的热力学^[7-11]、分析药物的作用过程^[12]和对水稻线粒体进行体外热分析^[13,14]等,但对水稻花药的研究少见报道,为此,我们对水稻雄性不育系花药进行了微量热分析,旨在为定量定性分析和鉴别水稻雄性不育系探索一个新方法。

1 材料与方法

1.1 取材

实验所用水稻材料为4种雄性不育系紫稻A、珍汕97A(野败型)、红莲粤泰A(红莲型)和马协A以及1个保持系紫稻B。以上材料均由武汉大学遗传所提供。从大田随机选取已抽穗的水稻植株,取稻穗中部颖花,以花药位于中部且未开裂的颖花为适宜试材,用碘-碘化钾染色法观察花药确定其败育程度。实验材料各取120个花药用于微量热测量,相应另取一部分用于形态观察和细胞学观察统计。

1.2 微量热测量

37℃条件下,将新鲜获得的花药样品装入呼吸测量瓶中,放进LKB2277生物活性检测器中进行微量热分析,预热1h,测定其24h等温呼吸曲线。仪器的结构和性能详见文献中有关介绍^[4,15]。

1.3 观察统计

随机取相应的5份材料的颖花,观察花药形态;碘-碘化钾染色观察花粉粒败育形态并统计花粉粒数。

2 结果与讨论

等温曲线表明(图1),保持系紫稻B花药呼吸代谢水平远远强于所有不育系花药,其起始热输出功率为450 μW ,而后迅速下降。而在所有不育系花药中,以红莲粤泰A花药呼吸代谢最强,其起始热输出功率为282 μW ,其次为马协A花药,其起始热输出功率为91.8 μW ,珍汕97A花药起始热输出功率为100 μW ,紫稻A花药呼吸代谢最弱,起始热输出功率为73.5 μW 。就等温呼吸曲线而言,除马协A曲线外,各曲线数值随时间的推移而逐渐减小,但又各有其特点:紫稻A、珍汕97A曲线相对平滑,红莲粤泰A曲线中间有一相对平缓的区域,紫稻B曲线快速下降。马协A曲线,起始后有一明显下降区域,6.5h后急剧上升,第7h达到峰值,而后趋于恒定。

同时,在本实验中,每一次测量都以紫稻A花药为对照。紫稻A曲线走势重复性好,说明本实验操作具可重复性。

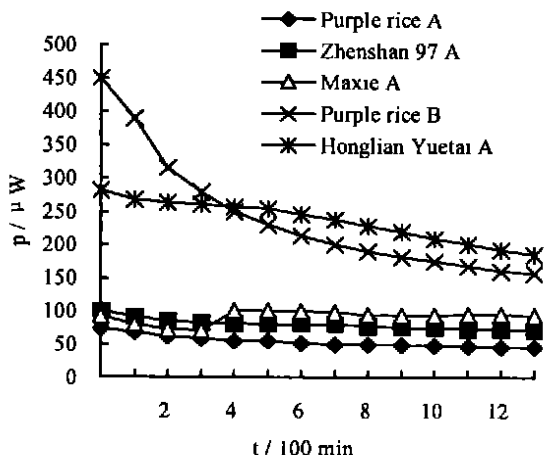


图1 几种水稻花药37℃等温呼吸曲线
(紫稻A、野败A、马协A和红莲粤泰A为不育系,紫稻B为保持系)

Fig. 1 Isothermal curves of anthers of four male sterile lines Purple rice A, Zhenshan 97 A, Honglian Yuetai A and Maxie A and one maintainer Purple rice B at 37℃

线粒体是细胞有氧呼吸的主要场所,是生物体能量的主要来源,也是核外基因的载体之一,在细胞质雄性不育的研究中占有重要的地位。线粒体的活动直接影响着生物体的各种生理功能。周涵韬等通过对马协细胞质雄性不育系及其保持系线粒体微量热分析,认为不育系线粒体在活性代谢时间、释放能量、代谢速率上明显低于保持系,其原因可能是不育系线粒体中参与能量代谢物质不丰富,酶系统活力较低^[11]。同时,同一植株不同的器官,呼吸速率有很大差异。生殖器官的呼吸比营养器官强,花的呼吸速率要比叶片快3~4倍。在花中,花蕊的呼吸要比花瓣及萼片强得多,雌蕊比雄蕊强,而雄蕊中以花粉的呼吸最强烈。我们对上述5种花药进行的细胞学观察表明,紫稻A花药尖细,后端分叉较长且翘起,仅含少量败育花粉粒;紫稻B为其保持系,花药充实饱满;红莲粤泰A花药较充实,败育较迟;珍汕97A、马协A花药相对空虚,花粉粒败育较早。保持系紫稻B花药正常,呼吸代谢旺盛,热输出功率高;不育系紫稻A花药呼吸代谢弱,热输出功率低。同时,红莲粤泰A代谢活动强于紫稻A、珍汕97A、马协A还可能与花粉粒的败育时期和数量有关。紫稻A、珍汕97A和马协A花粉粒败育发生在单核期,红莲粤泰A花粉粒败育发生在二核期;紫稻A、珍

汕 97A 由于所能形成的败育花粉粒多少有差别(表 1),反映了各自代谢活动的强弱;马协 A 败育时期略晚于珍汕 97A,所形成的败育花粉粒多为近圆形,远大于珍汕 97A 所形成的三角形或不规则多边形的败育花粉粒,所以,马协 A 花药样品的代谢活动强于珍汕 97A 样品;红莲粤泰 A 败育时期比紫稻 A、珍汕 97A、马协 A 晚,败育花粉粒已有淀粉充实,代谢活动强于前 3 种不育系。

表 1 水稻单花药花粉粒数统计
Table 1 Statistic of pollens of single anther of four rice CMS lines Purple rice A, Zhenshan 97 A, Maxie A and Honglian Yuetai A and one maintainer Purple rice B

| 编号 No. | 紫稻 A Purple rice A | 珍汕 97A Zhenshan 97 A | 马协 A Maxie A | 紫稻 B Purple rice B | 红莲粤泰 Honglian Yuetai A |
|------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------|
| 1 | 139 | 616 | 313 | 1 080 | 1 431 |
| 2 | 185 | 593 | 216 | 739 | 1 517 |
| 3 | 172 | 603 | 198 | 1 317 | 1 496 |
| 4 | 143 | 592 | 303 | 1 081 | 1 432 |
| 5 | 96 | 403 | 234 | 1 167 | 1 502 |
| 6 | 126 | 693 | 158 | 1 078 | 1 521 |
| 平均 Mean | 144 | 584 | 237 | 1 077 | 1 483 |

总之,水稻细胞质雄性不育是多种因素综合作用的结果。对花药的微量热法分析结果证明:花药的能量代谢与细胞质雄性不育有密切的关系。因此,微量热法分析花药对于研究花粉败育有一定的参考价值,可以为雄性不育的定性定量研究提供新的依据,同时也为水稻的研究提供了新的途径。可以预言,微量热法分析在生物学研究中必然会得到越来越广泛的应用,发挥更大的作用。

参考文献:

[1] 朱英国, 杨代常. 光周期敏感核不育水稻研究与利用. 武汉: 武汉大学出版社, 1992.

[2] Sivaramakrishnan S, Seetha K, Belum V S Reddy. Characterization of the A4 Cytoplasmic Male-steriles of Sorghum Using RFLP of mtDNA. *Euphytica*, 1997, **93**: 301 – 305.

[3] 凌杏元, 周培疆, 朱英国, 等. 水稻红莲型细胞质雄性

不育系与保持系差异显示和差别片段的分析. 植物学报, 2000, **42**(3): 284 – 288.

[4] Boling E A, Blanchar G C, Russed W J. Bacterial Identification by microcalorimetry. *Nature*, 1973, **241**: 472 – 473.

[5] 颜承农, 刘义, 上官云凤, 等. 微量热法用于细菌分类鉴定的研究. 化学世界, 1997, **38**(5): 252 – 255.

[6] 汤厚宽, 何佶, 刘义, 等. 细菌变异株生长热谱研究. 物理化学学报, 1999, **15**(12): 1 112 – 1 114.

[7] Liu J S, Zeng X C, Deng Y. Development and Applications of a Method for Kinetic Analysis of Consecutive Reactions under Iso-thermal Conditions. *Thermochimica Acta*, 1996, **273**: 53 – 60.

[8] 刘劲松, 曾宪诚, 邓郁, 等. 热动力学对比进度法 : 单底物酶促反应的热动力学研究. 化学学报, 1994, **52**(8): 767 – 773.

[9] Jaun Satiago-Garcia, Blanca A Delgado-Callo, Jaime Mas-Oliva. Thermal Analysis of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Mol C Bioch*, 2000, **209**: 105 – 112.

[10] 曾慧慧, 王夔, 王保民等. 微量热法研究肌动蛋白的聚合及顺铂的影响. 物理化学学报, 1994, **10**(3): 197 – 200.

[11] Haponiuk J T, Tercjak A. Dynamic Mechanical Thermal Analysis of Polyimide 6/Biopol Blends. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2000, **60**: 313 – 317.

[12] Macido R O, Gomes do Nascimento T, Soares Aragão C F *et al*. Application of Thermal Analysis in The Characterization of Anti-hypertensive Drages. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2000, **59**: 657 – 661.

[13] 周涵韬, 朱英国. 水稻马协细胞质雄性不育系及其保持系线粒体外热分析. 厦门大学学报, 1998, **37**(5): 757 – 762.

[14] 周培疆, 谢昌礼, 刘义, 等. 量热法研究线粒体代谢的热力学和动力学行为. 物理化学学报, 1995, **11**(11): 1 026 – 1 030.

[15] Forrest W W. *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press, 1972.