

# 玉米雄性不育细胞质细胞色素氧化酶活性及 ATP 含量的研究

夏 涛

(厦门大学生物系, 厦门 361005)

刘纪麟

(华中农业大学农学系, 武汉 430070)

**摘 要** 研究了玉米 Mo17 背景三种雄性不育细胞质(T.C.S)及正常细胞质(N)系小孢子发育过程中花药组织细胞色素氧化酶活性、ATP 含量及其变化。发现各不育胞质系细胞色素氧化酶活性及 ATP 含量的下降。讨论了玉米雄性不育细胞质的能量亏损现象。

**关键词** 细胞质雄性不育 细胞色素氧化酶 三磷酸腺苷 能量亏损

植物中有多条呼吸途径, 其中已知的有细胞色素途径和抗氰途径。前者是主要的呼吸途径, 包括三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化等过程。ATP 是能量的携带者和传递者, 是细胞各种物质合成和代谢活动的直接能源, 其含量的高低在植物的生长发育过程中起着重要的作用。我们在以前的研究中发现玉米雄性不育细胞质系花药组织总呼吸强度的下降及抗氰呼吸途径的缺乏或消失<sup>[5]</sup>, 为了进一步了解小孢子发生、败育过程中呼吸及能量代谢系统的变化, 我们选用同核异质系 (isonuclear alloplasmic line) 为材料, 系统地研究各种不育细胞质与正常细胞质系小孢子发育过程中细胞色素氧化酶的活性、ATP 含量及其变化, 以期能为玉米细胞质雄性不育性 (Cytoplasmic Male Sterility, CMS) 生化遗传机制的研究和认识提供帮助。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

选用 Mo17 背景的同核异质系 Mo17cms-C、Mo17cms-T、Mo17cms-唐徐 (S) 以及 Mo17 (N) 作为试验材料。所有材料均由华中农业大学玉米研究室提供。各同核异质系均经过 5~6 代以上的回交选育并表现稳定。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞色素氧化酶<sup>[7,8]</sup>。称取不同发育时期花药 0.5g, 加入 5ml 匀浆介质 (内含 0.5M 蔗糖、0.05 M pH 7.5 Tris-HCl、0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、5mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) 冰冻研磨。其匀浆通过三层尼龙纱过滤。滤液在  $800 \times g$  下离心 10min, 得到的上清液再离心 30 min

1993-11-13 收稿。

(19000×g)。通过这些步骤所得到的第一次沉淀、第二次沉淀和最后上清液分别称为沉淀部分、线粒体部分和上清液部分。

在四只反应杯中分别加入 0.1 ml pH 7.0 磷酸盐缓冲液, 0.07 ml 亚铁细胞色素 C (1%) (将细胞色素 C 溶解于 0.01 M pH 7.0 磷酸钾缓冲液中, 加若干毫克抗坏血酸钾, 过量的抗坏血酸通过透析的方法清除) 和 0.83 ml 蒸馏水。其中一只加入 0.01 ml 0.1 M 亚铁氰化钾作为对照, 另三只分别加入 10 $\mu$ l 沉淀部分、线粒体部分和上清液部分。在 550nm 处, 使用 Shimadzu uv-120-02 型分光光度计测量光密度值, 每 15s 间隔读数。细胞色素氧化酶活性依据一级反应速度常数  $K$  决定 ( $K=2.3 \log \frac{A_0}{A_{0+1}} \text{min}^{-1}$ )。

1.2.2 三磷酸腺苷 (ATP) . ATP 含量的测定依据发光光度法进行<sup>[2]</sup>。称取不同发育时期花药 0.5g, 加 5ml 沸腾蒸馏水置沸水浴中煮沸 15min, 冷却至室温后定容至 5ml, 置 25 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温。

在 FG-300 发光光度计 (上海植生所产品) 上, 加入 0.2ml 提取液于比色杯中移至测定点, 迅速注射 0.8 ml 荧光素酶液 (内含 5 ml 0.1M 双甘氨酸, 2ml 5 mM EDTA, 2 ml 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 1ml H<sub>2</sub>O, 10mg 牛血清蛋白, 30mg 荧光素酶粉 (内含荧光素)。其中双甘氨酸, 牛血清蛋白为上海生化所产品, 荧光素酶为上海植生所产品)。记录仪上显示反应曲线。根据标准曲线 (logATP 与反应曲线高度) 计算 ATP 的浓度。

2. 结果与讨论

## 2. 结果与讨论

### 2.1 玉米不育细胞质与正常细胞质小孢子发育过程中细胞色素氧化酶活性的变化及其差异

在对 Mo17 (N, T, C, S) 花药组织的呼吸测定中, 发现正常保持系呼吸强度显著大于不育细胞质花药<sup>[5]</sup>。为了进一步研究不育系和保持系之间在呼吸机制上存在的差异, 我们测定了小孢子发育不同阶段花药组织中细胞色素氧化酶的活性及其变化, 所得结果如表 1 所示。从表 1 中可以清楚地发现, 在整个小孢子发育过程中, Mo17(N)花药组织细胞色素氧化酶活性均高于三种不育细胞质。三种不育细胞质在小孢子发生和败育过程中花药组织细胞色素氧化酶活性的变化趋势是基本一致的。Mo17cms-C.S 在雄蕊原基期~减数分裂期活性显著升高 (但仍低于 Mo17 (N))。但在此之后, 伴随着小孢子的进一步发育和败育的开始, 其酶活显著地降低。对于 Mo17cms-T, 这种转折发生得更早, 在小孢子母细胞期后即开始下降。这些结果都表明, 细胞色素氧化酶活性在小孢子发生和雄性育性的表达中起着重要的作用。

从表 1 中还可以发现, 在花药组织细胞色素氧化酶总活性中, 线粒体部分所占比例最大。三种不育细胞质花药组织线粒体部分的酶活及其变化趋势与花药组织细胞色素氧化酶总活性的变化相似。这一结果也从另一个角度说明了线粒体在小孢子败育和不育性表达过程中的重要作用。

### 2.2 玉米不育细胞质与正常细胞质小孢子发育过程中 ATP 含量的变化及其差异

为了研究不育细胞质系和可育细胞质系在小孢子发生和发育过程中花药组织 ATP 含量的差异和变化, 我们以 Mo17 (N, T, C, S) 为材料, 利用荧光素-荧光素酶法<sup>[2]</sup>测定了花药

组织中 ATP 的含量, 所得结果如表 2 所示。

表 1 Mo17(N, T, C, S)小孢子不同发育阶段花药组织细胞色素氧化酶活性\* (k / gFW · min)

发育阶段	Mo17(N)	Mo17cms-C	Mo17cms-T	Mo17cms-唐徐(S)
雄蕊原基	2.7	3.8	3.5	2.3
	28.2 15.3	20.7 10.2	18.0 8.3	19.8 10.4
	10.2	6.7	6.2	7.1
小孢子母细胞	10.3	3.6	2.8	7.3
	49.3 28.1	30.8 19.2	29.2 20.7	32.1 11.5
	10.9	8.0	5.7	13.3
减数分裂	10.5	10.7	6.2	12.3
	57.3 26.5	48.2 23.1	18.3 9.1	49.0 21.9
	20.3	14.4	3.0	14.8
单核早期	7.3	3.6	2.3	4.7
	59.1 34.2	34.3 17.9	10.2 5.1	42.7 27.3
	17.6	12.8	2.8	10.7
单核中期	5.8	2.1	0	7.3
	53.2 29.1	20.1 12.1	6.7 4.3	41.0 29.7
	18.3	5.9	2.4	4.0
单核晚期	4.3			3.8
	50.7 26.7			38.5 19.2
	19.7			15.5
二核花粉	5.8			2.6
	73.2 30.1			22.9 11.1
	37.3			9.2
成熟花粉	14.1			
	172.1 51.2			
	106.8			

\* 表中每一栏右边的数据上、中、下分别代表上清液部分、线粒体部分和沉淀部分的活性。

表 2 Mo17(N,T,C,S)小孢子发育不同阶段花药组织 ATP 含量 ( $\times 10^{-10}$  mol / gFW)

发育阶段	Mo17(N)	Mo17cms-C	Mo17cms-T	Mo17cms-唐徐(S)
雄蕊原基	31.999 ±	31.434 ±	28.333 ±	28.806 ±
	0.634	1.076	0.519	0.892
小孢子母细胞	33.484 ±	34.889 ±	17.621 ±	17.696 ±
	1.816	5.425	2.611	4.060
减数分裂	35.289 ±	54.749 ±	64.991 ±	7.969 ±
	0.475	3.749	3.619	2.077
单核早期	35.359 ±	15.759 ±	5.554 ±	91.538 ±
	1.214	4.655	2.091	5.851
单核中期	34.722 ±	10.372 ±	0.722 ±	15.504 ±
	4.197	1.561	0.101	1.769
单核晚期	24.883 ±			14.953 ±
	3.899			3.419
二核花粉	28.557 ±			7.579 ±
	1.546			1.621
成熟花粉	25.287 ±			
	0.691			

对表2分析可以看出这样几个现象:第一,统计测验表明,对于Mo17cms-C, T在单核早期(败育开始发生)~单核中期(完全败育)花药组织中ATP含量显著地低于正常保持系Mo17(N)。对于Mo17cms-唐徐(S),在单核中晚期(败育即将发生)~二核花粉期(败育开始并完全败育)ATP含量也同样低于Mo17(N)。第二,从小孢子母细胞期~减数分裂期,Mo17cms-T, C有一显著的ATP合成与积累高峰,而到单核早期其含量急剧下降,这说明Mo17cms-T, C小孢子发育通过减数分裂期后耗费了大量的ATP能量。对于Mo17cms-唐徐(S),从减数分裂~单核早期也有一显著的ATP合成和积累高峰,到单核中、晚期其含量也急剧下降,说明Mo17cms-唐徐(S)小孢子发育通过单核早期后耗费了组织内大量的ATP。第三,Mo17(N)在整个小孢子发育过程中花药组织ATP的含量始终维持在一个平稳的浓度范围内。

这些现象都表明,伴随着小孢子发生的开始和小孢子败育的发生,不育胞质系花药组织中ATP含量及其变化出现了异常(低、峰值出现)。这种异常必然会影响到花药组织及小孢子的物质合成和能量代谢以及与之有关的生命活动,导致小孢子发育的畸形和败育。

### 2.3 玉米雄性不育细胞质小孢子发生、败育过程中的“能量亏损”

我们在以前对玉米Mo17(N, T, C, S)四种胞质材料花药组织呼吸速率的测定中发现,不育系总呼吸降低以及抗氰途径的缺乏或完全消失<sup>[5]</sup>。在本项研究中,我们发现不育细胞质系小孢子发育过程中花药组织细胞色素氧化酶活性的降低,而细胞色素氧化酶是线粒体内膜的标志酶,电子传递链的末端氧化酶<sup>[4]</sup>,它的活性大小可以反映出组织和线粒体的呼吸强度和速率。因此,不育细胞质系细胞色素氧化酶活性的降低说明不育细胞质系细胞色素途径也出现了缺陷。

另一方面,本项研究也发现在Mo17cms-C, T减数分裂过程中以及Mo17cms-唐徐(S,单核小孢子早期都消耗了大量的ATP,说明C、T、S三种不育细胞质在这两个时期内小孢子发育出现了缺陷,同时也造成小孢子发育后期ATP含量不足。其它一些研究报道<sup>[1,3]</sup>虽然在小孢子发育的某些时期表现出与本研究结果的差异,但不育系花药ATP含量的降低这一总的趋势是一致的。

综合以上几个方面的研究结果我们认为,玉米不育细胞质系小孢子发育过程中花药组织抗氰呼吸途径受到了阻止或抑制,细胞色素途径也出现了缺陷,因而降低了花药组织中的总呼吸强度,导致了呼吸系统、能量代谢系统的紊乱以及能量合成和供应的不足,即能量亏损,从而最终导致小孢子的败育和雄性不育的发生。在另一篇研究报道中<sup>[6]</sup>,我们讨论了这种“能量亏损”的直接原因。

## 参 考 文 献

- 1 王秀珍,滕晓月等.玉米及高粱花药中三磷酸腺苷(ATP)含量与细胞质雄性不育的关系.作物学报,1986,12(3):177~181
- 2 王维光,顾俭本.从叶中提取ATP方法的比较.植物生理学通讯,1986,5:54~55
- 3 邓继新,刘文芳等.HPGMR花药发育期花药ATP含量及核酸与蛋白质的合成研究.武汉大学学报(自然科学版),1990,3:85~88

- 4 沈同, 王镜岩等编. 生物化学. 北京: 人民教育出版社. 1980, 417~429
- 5 夏涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育性与组织抗氰呼吸关系的研究. 中国农业科学, 1988, 21(5): 39~43
- 6 夏涛. 玉米细胞质雄性不育性与植物激素关系的研究. 见: 中国科学技术协会首届青年学术年会论文集(农科分册). 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 128~132
- 7 Ohmasa M, Watanabe Y et al. A biochemical study of cytoplasmic male-sterility of corn: alteration of cytochrome oxidase and malate dehydrogenase activities during pollen development. Jap J Breed, 1976, 26(1): 40~50
- 8 Wharton DC, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. In: Method in Enzymology, 1967, 10: 245

## Cytochrome Oxidase Activity and ATP Content of Male-Sterile Cytoplasm in Maize (*Zea mays* L.)

Xia Tao

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Liu Jilin

(Department of Agronomy, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** To understand the biochemical mechanism of cytoplasmic male sterility (CMS), we used isonuclear alloplasmic line on Mo17 nuclear background with three male-sterile cytoplasm T, C, Tang Xu (S) and normal (N) cytoplasm for dynamic study of respiration and energy metabolism system. It was found that the activity of cytochrome oxidase and the content of ATP of male-sterile anthers were greatly reduced during the stage of microsporogenesis and development. By surveying the author's published research works about the total respiration activity and cyanide-resistant respiration of CMS in maize, the appearance of "Energy Deficiency" of male-sterile anthers was also discussed in this paper.

**Key words:** Cytoplasmic male sterility; Cytochrome oxidase; Adenosine triphosphate (ATP); Energy deficiency