

· 研究论文 ·

BAU-9403 对同工酶活性影响的研究 ——小麦化学杂交剂离体筛选初探

李则轩^{1,3}, 郭小丽², 刘冬成¹, 王道全², 陈万义², 黄占景³, 张爱民^{1*}

(1. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; 2 中国农业大学, 北京 100094;
3 河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050016)

摘要: 合成和筛选优良的化学杂交剂是应用化学杂交剂培育杂交种的关键之一。化学杂交剂的筛选主要通过田间试验, 费时费工, 建立室内离体筛选的方法很有必要。通过研究化学杂交剂BAU-9403的作用机理, 发现其对同工酶活性有显著影响, 用BAU-9403处理离体过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶, 分析其对同工酶活性影响与大田试验的一致性, 探讨建立化学杂交剂离体筛选的可能性。试验结果表明, 离体直接加药处理对过氧化物酶同工酶的影响与大田喷施的影响基本一致, 对酯酶同工酶的作用不明显, 但也和大田处理一致。试验表明, 有可能通过离体试验进行化学杂交剂的筛选, 认为有必要进行进一步的研究和探讨。

关键词: 化学杂交剂; 离体筛选; 同工酶; 小麦

中图分类号: Q 946.5; S511.035 文献标识码: A 文章编号: 1008-7303(2004)04-0018-05

Effects of Chemical Hybridizing Agent BAU-9403 on Activity of Isoenzymes in Wheat Anther ——Preliminary Results of Chemical Hybridizing Agent Screening *in vitro*

LI Ze-xuan^{1,3}, GUO Xiao-li², LIU Dong-cheng¹, WANG Dao-quan²,
CHEN Wan-yi², HUANG Zhan-jing³, ZHANG Aimin^{1*}

(1. Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, Beijing 100101, China;
2 China Agricultural University, Beijing 100094, China;
3 Life Science College, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: Chemical hybridizing agents (CHAs) are the key factor for producing hybrid seed in CHAs hybrid development system. Generally the field test was conducted to screen optimum CHAs and costs a lot and requires a lot of labour. Based on the effects of CHAs on isoenzymes, the method of adding CHA (BAU-9403) *in vitro* was employed to test the possibility to screen CHAs *in vitro*. It was proved that CHA had similar effects on isoenzymes activity of peroxidase and esterase when added *in vitro* to field test but the effects on esterase was not distinct. The results suggested CHAs could be screened by *in vitro* methods and the further work is valuable.

Key words: Chemical Hybridizing Agents (CHAs); screen *in vitro*; isoenzyme; wheat

收稿日期: 2004-02-26; 修回日期: 2004-09-05

作者简介: 李则轩(1978-), 男, 河北人, 现为清华大学生物物理方向博士研究生; 张爱民(1957-), 男, 博士, 中科院遗传发育所工作

* 通讯作者; 联系电话: 010-64889347; E-mail: amzhang@genetics.ac.cn

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2001AA241041, 2002AA207004); 中科院重要方向性项目(KSCX2-SW-304); 国家“十五”科技攻关(2001BA308A01-06)资助项目

杂种优势是生物界的普遍现象,也是作物增产的重要途径。1951年,木原均将普通小麦的细胞核导入尾形山羊草的细胞质中产生雄性不育,由此揭开了小麦杂种优势利用研究的序幕。国内外杂种小麦研究已经历了50多年,投入了相当多的人力和财力,虽然取得了显著的进展,已有杂种小麦品种注册或通过审定在生产上推广种植,但与玉米和水稻等作物相比,杂种小麦远没有取得应有的经济效益和社会效益^[1,2]。

目前,可用于生产小麦杂交种的途径主要有三种,即CM S (Cytoplasmic Male Sterility)——细胞质雄性不育系统,CHA (Chemical Hybridizing Agents)——化学杂交系统和PTSM S (Photoperiod Temperature Sensitive Male Sterility)——光温敏核不育系统。就小麦杂种优势利用来说,利用CHA生产杂交种是更易在生产上取得突破的途径,目前美国、法国及印度等国家注册的杂交种多为利用CHA生产的杂交种。CHA途径具有亲本选择自由,制种程序简单等特点,且避开了环境因子对育性的影响和对恢(复系)保(持系)关系的制约^[3],但必需有性能优良的CHA,因此合成筛选CHA是开展CHA途径作物杂种优势利用的首要工作。近些年不断有新研制出的化学杂交剂投入试用^[4],但是应当承认,找到一个能产生强杂种优势的亲本组合不容易,而找到一个去雄效果好而稳定、有效用药时间长、无残留、对小麦生长无不良副作用且价格低廉的化学杂交剂则更加不容易。

目前CHA的筛选主要通过温室或田间直接喷施的方法来进行。不但一年只能进行一次,而且工作量大,费时费工,成本高,时间长。作者在研究不同CHA诱导小麦雄性不育机理的过程中,发现不同CHA均对主要的同工酶活性有重要影响,因此设想若能通过提取作物一定器官或部位的同工酶,通过离体加入CHA的方法研究其对同工酶活性的影响,建立CHA离体筛选的方法,就可以进行大量快速的室内CHA筛选工作。本文报道用化学杂交剂BAU-9403进行离体试验并和大田喷施结果进行比较,探讨化学杂交剂离体筛选的可能性。

1 材料和方法

1.1 供试材料

小麦品种BAU-3159(为中国农业大学育成的

矮秆品系)。试验在中国农业大学昌平实验站进行,按常规方法种植栽培。

化学杂交剂BAU-9403 [1-(4-氯苯基)-1,4-二氢-4-氧-6-甲基吡嗪-3-羧酸正丙酯] (以下简称9403) (由中国农业大学研制,提供),剂型为10%乳油。

1.2 试验方法

供试小麦品种分为两个小区种植,一个小区在小花发育的雌雄蕊分化期进行9403处理,剂量为0.75 kg/hm²,药液施用量为300 L/hm²。另一个小区为对照。根据小孢子发育时期,分别收集处于四分体、单核、双核和三核时期的花药。所有花药收集后立即放入-20℃冰箱保存待用。

花药在液氮中研磨,用Tris[三(羟甲基)氨基甲烷盐酸缓冲液]-柠檬酸提取同工酶。4℃离心5 min (10 000 g),取上清液。将对照材料提取的上清液分成两部分,其中一部分分别按1:100 (CHA体积:酶液体积,下同)、1:50、1:10的比例加入9403。然后将所有酶液用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析其过氧化物酶同工酶和酯酶同工酶。具体步骤参见文献[5]。最后制成干胶,拍照。

2 结果与分析

图1和表1的结果表明,对照与处理之间的过氧化物酶带有明显的差异,处理中的条带染色较浅,并且这些有变化的酶带几乎都处于相同的位置(带9,带10,带11,带12),也就是说9403确实可以直接影响过氧化物酶的活性,并且特异地作用于其家族中的某几种酶。更令人感兴趣的是,与大田中喷药后的酶谱相比较,离体加药显示了相似的谱带变化,受影响的条带都处在相近的位置,活性有改变的酶带基本上集中在中带区域,慢带和快带区域的酶所受的影响较小。

这些结果表明,9403诱导小麦花药雄性不育的可能机制之一就是直接干扰植物体内起重要作用的酶类活性,进而影响其生长发育。这种作用主要表现为抑制酶的活性,但是,作者也注意到二核期大田处理的花药其酶带的活性有所增强(带9,带10,带11),这与体外加药的结果相反,可能是在活体植株体内有另外尚不清楚的某种机制在起作用。尽管体外加药的实验证实了9403可以直接影响酶活性,但这并不表明9403诱导雄性不育的过程不涉及DNA、mRNA层次的变化。

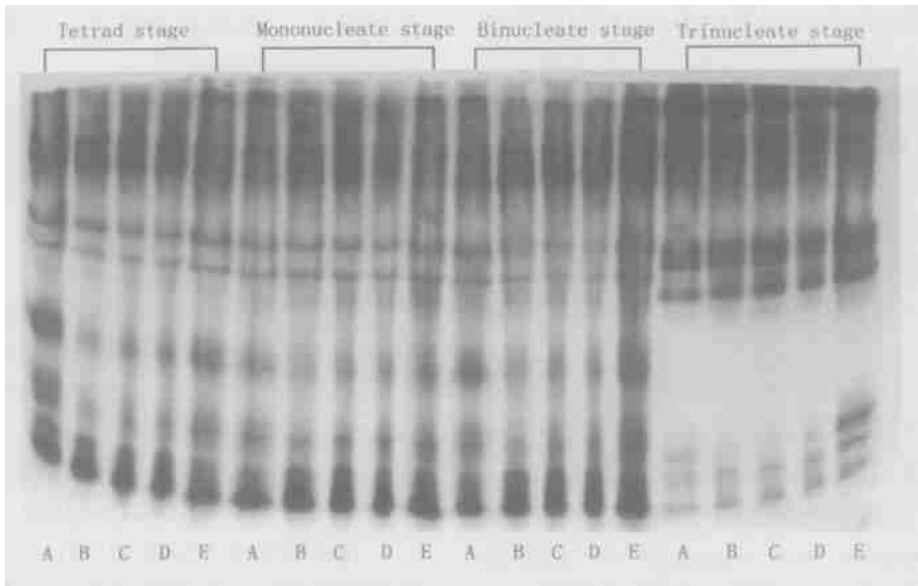


Fig 1 Effects of CHA BAU -9403 on peroxidase of wheat anther
 A: CK; B: 1 100 (CHA volume enzyme solution volume);
 C: 1 50; D: 1 10; E: field treatment

Table 1 Effects of CHA BAU -9403 on isoenzyme activity of peroxidase*

Band	Tetrad stage					Mononucleate stage					Binucleate stage					Trinucleate stage				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
3	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
4	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
6																++	++	++	++	++
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
8																++	++	++	++	++
9	++	-	-	-	+	+	-	-	-	+	++	-	-	-	++					
10	++				+	-				-	+				++					
11	++	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	++					
12																-			-	+
13	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	+	+	+	+
14	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++					
15	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	+	+	+	+
Total	11	11	11	11	12	12	11	11	11	12	12	11	12	12	12	10	9	9	10	10

* ++: Strong; +: Relative strong; -: Weak A: CK; B: 1 100 (CHA volume Enzyme solution volume); C: 1 50; D: 1 10; E: Field treatment The same as in the following table

9403 对酯酶的直接作用效果不明显, 与大田直接喷施对酯酶的影响结果相同(图2 及表2), 说明9403 对蛋白质的作用是有选择性的。CHA 诱导小麦雄性不育的机制是复杂的, 可能包含对多种不同

代谢途径的影响, 可能涉及数量众多的基因, 因此要清楚地了解化学去雄的机理, 必须从多个层次(细胞结构, 蛋白质, DNA, mRNA)应用分子生物学、细胞生物学等技术, 开展更深入的研究。

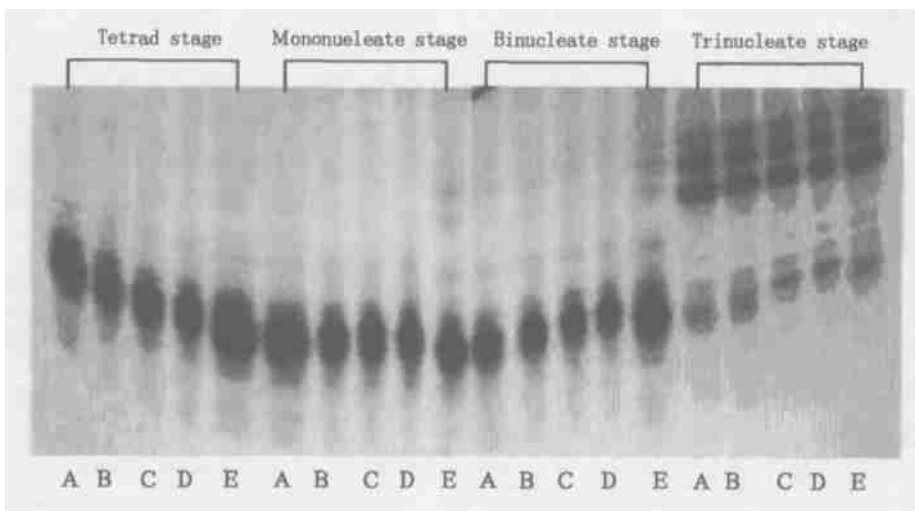


Fig 2 Effects of CHA BAU -9403 on esterase of wheat anther
 A: CK; B: 1 : 100 (CHA volume : Enzyme solution volume);
 C: 1 : 50; D: 1 : 10; E: Field treatment

Table 2 Effects of CHA BAU 9403 on isoenzyme activity of esterase

Band	Tetrad stage					Mononucleate stage					Binucleate stage					Trinucleate stage				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-
8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

3 讨论

有关化学杂交剂对小麦花药同工酶的影响,前人已经做了许多有意义的研究^[6,7],但尚未见到离体加药分析的相关报道。近年来,在新农药的筛选方面,以靶标酶作筛子已引起各方面的重视。作者设计本试验的主要目的是了解 9403 是否可以直接影响蛋白质的活性,进一步诱导雄性不育的产生。试验结

果不仅证实了作者的设想,也使我们意识到利用这种策略来建立化学杂交剂的离体筛选方法的可行性。主要原因在于: 1) 9403 确实可以在离体条件下直接作用于同工酶,而不用通过活体植株复杂的体内调节机制来诱导雄性不育,这是建立离体筛选的基础; 2) 在离体状况下,化学杂交剂所影响到的同工酶与大田试验中其所作用的酶带具有很高的相似性,也就是说在活体、离体两种情形下,同一种CHA

可以影响同工酶家族中相同的酶带,而这些酶带活性的变化是与植株雄性不育的发生高度相关的,这是离体筛选的基础。

化学杂交剂离体筛选方法的建立将是一项十分艰巨的任务,存在着不少困难。主要在于以下几方面: 1) 活体植株在受到外界药剂处理后,会发生一系列复杂精微的变化,而离体试验往往不能反映诸多的生理生化调节,这就为日后筛选的准确性埋下了隐患。2) 从本试验中可以看到9403的作用是有选择性的,它几乎对酯酶没有影响,而对过氧化物酶的影响显著,这种选择性可能为今后筛选的试验基础带来一定的限制性,使得我们在筛选之前必须了解该CHA究竟会作用于哪些蛋白质。3) 只是离体分析同工酶或者蛋白质是远远不够的,还要综合分析DNA和RNA,才可能建立完善的筛选方法。另外,作者只对一种化学杂交剂(BAU-9403)进行了研究,研究虽是初步的,但其重要的意义在于提示我们对化学杂交剂进行离体筛选是可能的。

参考文献

- [1] HE Zhong-hu (何中虎), ZHANG A im in (张爱民). Advances of Wheat Breeding in China (中国小麦育种研究进展) [M]. Beijing (北京): Chinese Science and Technology Press (中国科学技术出版社), 2002
- [2] HUANG Tie-cheng (黄铁城). Advances of Hybrid Wheat Research, Problem and Prospect (杂种小麦研究进展, 问题与展望) [M]. Beijing (北京): Beijing Agricultural University Press (北京农业大学出版社), Beijing: 1990
- [3] Zhang A M, Nie X L, Liu D C, et al. Advances of hybrid wheat breeding in China [J]. *Cereal Research Communications*, 2001, 29(3-4): 343-350
- [4] CHEN Wan-yi (陈万义). 化学杂交剂的进展 [J]. *Pesticide (农药)*, 1999, 38(1): 1-6
- [5] HU Neng-shu (胡能书), WAN Xian-guo (万贤国). Technology of Isoenzyme and its Application (同工酶技术和应用) [M]. Changsha (长沙): Hunan Science and Technology Press (湖南科学技术出版社), 1985
- [6] SHEN Yin-zhu (沈银柱), LU Zhi-yi (刘植义), HUANG Zhan-jing (黄占景), et al. 不同化学杂交剂(CHA)对小麦花药同工酶影响的研究 [J]. *Hereditas (遗传)*, 1999, 21(5): 41-46
- [7] SU Jun-ying (苏俊英), LU De-bin (吕德彬), CHENG Xi-yong (程西永), et al. 化学杂交剂 Genesis 及 Sc2053 对小麦穗部过氧化物酶活性的影响 [J]. *J Henan Agric Univ (河南农业大学学报)*, 2000, 34(4): 309-311, 328

(责任编辑: 金淑惠)

公 告 二

据中国科学技术信息研究所2004年发布的《中国科技期刊引证报告》[1576种中国科技论文统计源期刊(中文核心期刊)], 2003年出版的《农药学学报》各项文献计量指标如下:

代码	总被引 频次	影响 因子	即年 指标	他引 总引比	引用 刊数	扩散 因子	被引半 衰期	载文量	基金论 文比
H404	133	0.455	0.078	0.82	51	38.3	2.92	64	0.66

与2002年度(2878种统计刊源)的统计数据相比,《农药学学报》的影响因子由0.311提高至0.455,增加46.3%。在今年发布的1576种统计源期刊“影响因子”总排序中,《农药学学报》排在第372位;在59种化学工程类期刊中,其影响因子排在第12位(比上一年度提升30位);在73种农学类期刊中,其影响因子排在第19位。