

线粒体杂种优势和线粒体互补

中国科学院生物物理研究所三室二组

选育和推广农作物的优良品种对提高粮食产量,改进粮食品质具有十分重要的作用。杂交育种是选育优良品种的有效途径之一。我国对农作物杂种优势的利用已经在粮食增产上取得显著的效果,但强优势杂交种的获得一般都是在大量杂交组合与多年田间试验的基础上获得的。因此长期以来,人们都希望找到一些有效的指标来预测亲本组合的杂种优势,以缩短选育良种的年限和减轻工作量。线粒体是细胞的“能力站”为细胞各种生理活动提供能量。1966年 McDaniel 等^[1]将杂种优势与线粒体活性联系起来考虑,提出优势杂种往往较其亲本具有较高的线粒体活性。这叫做“线粒体杂种优势”。此外,能产生杂种优势的两个亲本的线粒体于离体条体下等比混合时,它们的活性超过任何一个亲本并接近杂种线粒体的水平。这种现象称为“杂种优势的线粒体互补作用”。利用这个现象可以预测两个亲本杂交后能否产生杂交优势。McDaniel 等^[1-3]的工作曾引起广泛的注意和重视。近年来,英国、奥地利、西德、匈牙利等国科学工作者也相继进行了类似的实验^[4-8]。但大多数都未能获得象 McDaniel 等人那样明显的结果。国内从 1972 年以来也有一些单位相继开展这方面的研究,对线粒体杂种优势和线粒体互补作用亦得到不同的结果,存在着不同的看法^[9,10]。我们在张家口坝下农科所、北京农林科学院作物所等单位协助下,主要对玉米线粒体杂种优势和线粒体互补作用的可靠性进行了验证。具体做法是:

甲、用氧电极法同时测定线粒体的:(1)氧

化活性;(2)呼吸控制;(3)氧化磷酸化效率(ADP/O);(4)加入 ADP 前后耗氧量之比等四个指标以进行综合分析。

乙、用瓦氏微量检压法和氧电极法同时测定线粒体活性并进行比较。

丙、McDaniel 等认为两个亲本线粒体之间的相互接触可能是表现互补作用的物理基础。我们采取一些有利于线粒体相互接触的措施(包括低渗处理、“老化”等)以观察能否促进互补现象的表现。

由于种子来源有限,我们重点对张单 9 号,京黄 113 两个组合(包括亲本和杂交种)在上述三方面都进行测试。此外,对另外三套有明显杂种优势的组合和一套杂种优势不明显的组合(门 14 × 公社好)也进行了部分项目的测试对比。

一、实验材料和方法

1. 发芽

干净种子用 0.1% 氯化汞浸泡 10 分钟灭菌,经清水冲洗半小时,再在水中浸泡 15 小时左右,然后均匀平铺在搪瓷盘内的纱布上。在 28℃ 的恒温箱中发芽 2—3 天。为了使萌发幼苗的长度尽可能一致,不同种子催芽时间可以根据具体情况加以掌握。在整个发芽过程中注意控制湿度。

2. 分离线粒体

详细的制备步骤总结于图 1。图中全部分离过程应严格控制在 0—4℃ 进行。玉米黄化幼苗剪下后,称取一定重量在冰箱中放置 1 小

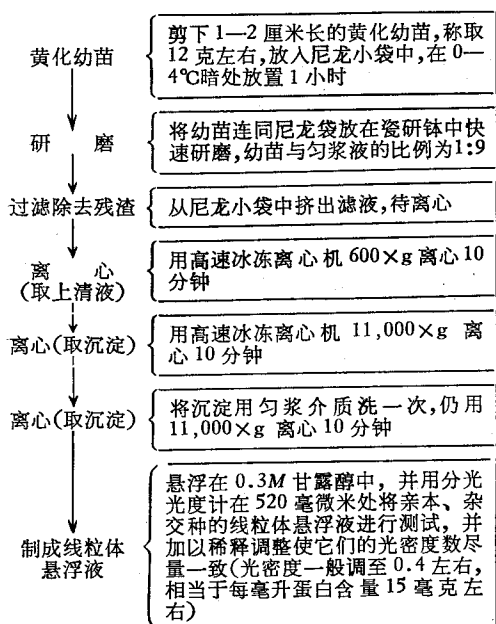


图1 玉米线粒体的制备程序

时。然后倒入双层的尼龙袋中,以 1:9 的比例加入匀浆介质(0.25M 蔗糖, 0.067M 磷酸缓冲液 pH 7.2, 0.005 MEDTA, 0.75 毫克/毫升牛血清清蛋白)在瓷研钵中磨碎。过滤除去残渣。上述操作都在低温下进行。然后将过滤液用冰冻离心机进行离心,第一次 600×g 离心 10 分钟,取上清液。第二次 11,000 × g, 离心 10 分钟。沉淀的线粒体用匀浆介质洗一次。再用同样速度离心 10 分钟,所得线粒体悬浮于 0.3M 甘露醇中备用。为了进行比较,将亲本和杂种线粒体悬浮液先用分光光度计在 520 毫微米处进行测试并加以稀释调整使它们的蛋白质含量尽可能一致。

3. 测定

线粒体氧化活性和氧化磷酸化用两种仪器进行测定。氧电极法用我室自制的振动铂电极装置并连接电子电位差自动记录仪连续记录。反应介质为 0.01MKCl, 0.005 MMgCl₂, 0.1M 磷酸缓冲液 pH7.2, 0.1M Tris-HCl pH7.2, 0.3M 甘露醇, 0.75 毫克/毫升牛血清清蛋白, 反应液总体积 2 毫升。加入 0.2M α-酮戊二酸 50 微升, 0.05M ADP 8—10 微升, 反应温度 28℃。氧电极法测定线粒体活性时由于每次只能测定一个样品(约需 12 分钟),因此整个测试比较过程需

要较多的时间。为了尽量减少线粒体因放置时间过长发生“老化”而引起误差,测试样品在线粒体分离后 20 分钟开始(根据条件试验,线粒体制备后活性迅速下降,但在分离后 20 分钟—2 小时期间内活性变化比较缓慢),而且亲本、杂交和互补样品的测试采取交叉的方式进行。此外,我们还用瓦氏微量检压法同时进行比较。测定时的反应介质为:甘露醇 0.3M, KCl 0.01M, MgCl₂ 5 mM, 磷酸缓冲液 0.01M pH 7.2, Tris-HCl 0.01 M pH 7.2, 牛血清清蛋白 0.75 毫克/毫升, ATP 0.75 mM。α-酮戊二酸 0.014 M。支管中加入 0.15 毫升 0.01M 葡萄糖和己糖激酶(自制产品),反应液体积 1.5 毫升。反应温度 28℃。温度平衡 5 分钟,然后关闭测压计活塞,开始计数。5 分钟后将支管内含物倾入反应液(对照支管中放置 50% CCl₃COOH 0.3 毫升),然后继续计数。反应中止后测定无机磷变化以计算磷酸化程度。

线粒体蛋白质浓度用 Lowry 氏方法^[12]测定。

二、实验结果和讨论

1. 用氧电极法测试线粒体的杂种优势和线粒体互补作用

对五套有明显杂种优势(包括亲本、杂交种)的线粒体的氧化活性,呼吸控制,氧化磷酸化效率(ADP/O),加 ADP 前后耗氧比值进行了测定。实验结果总结于表 1。从表中可以看出五套优势杂种线粒体的氧化活性和加 ADP 前后耗氧比均高于亲本,有三套杂种线粒体的 ADP/O 值高于其亲本的平均值。

然而,优势杂种亲本线粒体在体外等比混合后,除氧化活性一项指标有一定的互补作用外(其中成单 4 号组合比较明显),其余三项指标在大多数组合中都没有表现出明显的互补现象。因此,从反映线粒体活性的四个指标的测定结果综合来看,线粒体的杂种优势是比较明显的。氧化活性和加 ADP 前后耗氧比值两个指标与亲本比较都有显著差别,但线粒体的互补现象除氧化活性一项指标有一定表现外,其

表 1 杂种优势明显的玉米线粒体的测试结果

测定项目 结果 组合名称	氧化活性 (微克分子 O ₂ /分/毫克蛋白)		呼吸控制		ADP/O		加 ADP 前后 耗氧比	
		相对* 比值		相对 比值		相对 比值		相对 比值
敦子黄 (♀)	50.37		1.53		1.37		3.00	
w591 (♂)	41.77		1.48		1.28		3.11	
京黄113 (×)	51.50	1.11	1.40	0.93	1.17	0.88	3.14	1.02
敦+W591 (+)	41.83	0.90	1.56	1.04	1.07	0.81	3.00	0.98
张系5 (♀)	33.06		1.42		1.51		3.63	
金0—2 (♂)	37.98		1.48		1.42		3.85	
张单9号 (×)	40.36	1.13	1.43	0.98	1.57	1.07	4.15	1.10
张+金 (+)	38.09	1.07	1.51	1.04	1.43	0.97	3.61	0.96
门可比 (♀)	58.23		1.45		1.47		4.25	
金0—3 (♂)	53.72		1.45		1.56		3.75	
成单3号 (×)	66.29	1.18	1.45	1.00	1.38	0.91	4.50	1.12
门+金 (+)	59.63	1.06	1.40	0.96	1.43	0.94	4.00	1.00
OH43 (♀)	40.18		1.85		1.08		2.20	
矮广10 (♂)	36.50		1.55		1.57		2.40	
成单4号 (×)	47.02	1.22	1.35	0.79	1.51	1.14	3.05	1.32
OH+矮 (+)	45.85	1.19	1.55	0.91	1.23	0.93	3.20	1.39
多229 (♀)	56.38		1.60		2.40		4.00	
金02—1 (♂)	48.54		1.60		2.00		4.12	
宛早1号 (×)	59.87	1.14	1.40	0.87	2.76	1.25	4.20	1.02
多+金 (+)	42.25	0.80	1.50	0.93	1.83	0.85	3.30	0.80

* 系与亲本平均值之比

表 2 低渗、“老化”对线粒体杂种优势和线粒体互补的影响

类别	测定项目 结果 张单9号	氧化活性 (微克分子 O ₂ /分/毫克蛋白)		呼吸控制		ADP/O		加 ADP 前后 耗氧比	
			相对 比值		相对 比值		相对 比值		相对 比值
正常	♀	33.06		1.42		1.51		3.63	
	♂	37.98		1.48		1.42		3.85	
	×	40.36	1.13	1.43	0.98	1.57	1.07	4.15	1.10
	+	38.09	1.07	1.51	1.04	1.43	0.97	3.61	0.96
低渗	♀	30.40		1.60		1.39		2.30	
	♂	30.40		1.56		1.68		2.20	
	×	37.82	1.24	1.76	1.11	1.55	1.01	2.36	1.04
	+	24.55	0.80	1.55	0.98	1.78	1.16	2.06	0.91
老化	♀	22.00		1.27		1.40		3.50	
	♂	23.58		1.40		1.32		4.10	
	×	28.51	1.25	1.36	1.00	1.50	1.10	4.40	1.15
	+	22.00	0.96	1.30	0.96	1.63	1.19	4.10	1.06

它指标都不明显。

线粒体互补作用的影响

2. 低渗、“老化”处理对线粒体杂种优势和

McDaniel 等人认为杂种优势的两个亲本线

表3 低渗、“老化”对线粒体杂种优势和线粒体互补的影响

类别	测定项目 结果		氧化活性 微克分子 O ₂ /分/毫克蛋白		呼吸控制		ADP/O		加 ADP 前后 耗氧比	
	京黄113			相对 比值		相对 比值		相对 比值		相对 比值
正常	♀		50.37		1.53		1.37		3.00	
	♂		41.77		1.48		1.28		3.11	
	×		51.50	1.11	1.40	0.93	1.17	0.88	3.14	1.02
	+		41.83	0.90	1.56	1.04	1.07	0.81	3.00	0.98
低渗	♀		19.65		1.35		1.71		1.62	
	♂		33.91		1.51		1.88		2.15	
	×		46.01	1.71	1.64	1.14	1.61	0.89	2.71	1.44
	+		20.53	0.76	1.90	1.32	1.89	1.05	1.55	0.82
老化	♀		27.78		1.45		1.37		1.84	
	♂		27.16		1.97		2.05		2.11	
	×		35.69	1.29	1.40	0.81	1.16	0.67	3.09	1.56
	+		26.17	0.95	1.45	0.84	1.49	0.87	2.25	1.14

粒体之间的相互接触可能是互补现象的物理基础。我们将玉米线粒体经过低渗或“老化”处理,使它们进行一定程度的膨胀,以有利于线粒体膜结构间的相互接触,但又不至于使其功能受到较严重的影响。具体做法是:低渗处理时将分离的线粒体悬浮于较低浓度(0.2M)的甘露醇中,温度仍保持在0—4℃。“老化”系指分离后的线粒体在冰浴中放置2小时后,再在27℃放置10分钟然后进行测定,结果见表2、表3。

从表2,3可以看出,与动物线粒体不同,玉米线粒体经低渗或“老化”处理后,呼吸控制和氧化磷酸化效率的变化不大,但氧化活性普遍降低。值得注意的是杂种线粒体降低的幅度较小,因而与亲本线粒体的差距拉大,使相对比值增大。加ADP前后耗氧比值也有类似的变化。其中京黄113(表3)组合比较明显。其它两个指标(呼吸控制,和ADP/O)经低渗或“老化”处理后相对比值都没有规律性的变化。对于互补现象,低渗或“老化”处理都没有明显的影响。从表2,3还可以看出张单9号亲本线粒体等比混合液经“老化”,低渗处理后,ADP/O指标的互补现象似乎比较明显,但其它三个指标都没有出现类似的变化。

综合上述结果可以看出,低渗、“老化”处理

能促进、加强线粒体杂种优势的表现。这进一步说明优势杂种线粒体比亲本线粒体在品质方面具有明显的优异性。我们亦曾对它们的线粒体产率进行过比较,实验结果表明玉米优势杂种的线粒体含量(根据蛋白质含量测定)与亲本相比并未发现有明显的差别。

低渗或“老化”处理对促进线粒体的互补作用似乎并没有明显的效果。McDaniel等^[1]还认为:线粒体必须维持一定的浓度才能表现互补作用,因此互补现象对稀释效应非常敏感。但是,我们用不同浓度的线粒体来进行测试亦没有发现有明显的互补作用。总之,实验结果表明,采取一些有利于线粒体相互接触的措施并没有观察到能促进互补现象的表现。

3. 用瓦氏微量检压法测定线粒体杂种优势和线粒体互补作用

瓦氏微量检压计虽不象氧电极法那样能测定线粒体的氧化活性、氧化磷酸化等活力的动态过程,而且测定时线粒体的用量亦较多,但具有能同时测定较多样品的优点,有利于亲本、杂种和互补样品同时进行比较。四套有明显杂种优势的玉米种子的实验结果表明,优势杂种线粒体的氧化活性均明显高于其亲本(见表4),而且氧化磷酸化效率(P/O)亦出现相同结果。与氧电极法相比较,线粒体杂种优势的表现更

表 4 瓦氏测压法测定线粒体杂种优势和线粒体互补

测定项目 结果 组合名称	氧化活性(微升 O ₂ /10 毫克蛋白/小时	P/O		
		相对 比值		相对 比值
张系 5 (♀)	289.3		1.41	
金0—2 (♂)	261.6		1.27	
张单 9 号 (×)	320.0	1.16	1.96	1.46
张+金 (+)	319.5	1.16	1.35	1.00
敦子黄 (♀)	353.8		1.92	
W591 (♂)	281.4		1.83	
京黄113 (×)	431.9	1.36	2.22	1.18
敦+W591 (+)	305.8	0.97	2.04	1.10
门可比 (♀)	247.5		1.64	
金0—3 (♂)	358.8		1.49	
成单 3 号 (×)	434.1	1.43	1.66	1.06
门+金 (+)	299.0	0.99	1.79	1.16
OH43 (♀)	303.8		1.57	
矮广10 (♂)	205.0		1.65	
成单 4 号 (×)	314.5	1.24	2.07	1.29
OH+矮 (+)	298.2	1.22	1.40	0.88

为显著。这可能与瓦氏检压法的测定时间较长(30 分钟左右)有关。至于线粒体的互补作用,四套种子中有两套在氧化活性的指标有表现。另两套则在 P/O 比值表现出互补现象。换言之,这两种指标出现互补作用的情况并不一致。这与 McDaniel 等^[1-3]所获得的结果是很不相同

的。

综合上述三方面实验结果可以看出,优势杂种线粒体在氧化活性、氧化磷酸化效率以及对低渗、“老化”的耐受性方面都明显优于两个亲本线粒体。我们亦曾用杂种优势不甚明显的玉米种子(门 14×公社好)作对比实验,结果无论用瓦氏检压法还是氧电极法所测各项指标都不优于亲本(表 5),这样,线粒体的杂种优势就进一步得到了验证。

玉米的优势杂种具有较快的萌发和生长以及较强的呼吸作用。因此,作为细胞“能力站”的线粒体表现出杂种优势的现象是可以理解的。此外,线粒体还具有一定程度的自主性。它含有 DNA、RNA、DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、核糖体、转移-RNA 和氨基酸活化酶,在体内和体外有一些独立合成蛋白质的能力。因此很可能线粒体的遗传物质参与了杂种优势的形成。密度梯度离心的实验结果表明,玉米优势杂种除含有两个亲本所具有的线粒体外,还出现另一类型的线粒体。这可能是通过父、亲本的线粒体相互融合而产生的。可以想象,在这个过程中线粒体 DNA 可能会进行重组作用。

杂种优势是一个较为复杂的现象。除生长优势外,还包括诸如抗病性,对冷、热、旱、涝等环境条件的适应性。线粒体是细胞的能量代谢

表 5 杂种优势不甚明显的玉米线粒体的测试结果

测定项目 材料名称	氧化活性		呼吸控制		ADP/O		加 ADP 前后耗氧比	
	微克分子 O ₂ /分/毫克蛋白	相对 比值		相对 比值		相对 比值		相对 比值
门14 (♀)	36.40		1.40		1.62		2.7	
公社好 (♂)	24.78		1.65		1.21		2.5	
门14×公社好	21.76	0.71	1.45	0.95	1.21	0.85	2.3	0.88
门14+公社好	28.69	0.93	1.37	0.89	1.38	0.97	2.8	1.07
测定项目 材料名称	氧化活性				P/O			
	微升 O ₂ /10 毫克蛋白/小时	相对 比值				相对 比值		
门14 (♀)	319.2				1.52			
公社好 (♂)	220.4				1.58			
门14×公社好	108.3	0.40			1.16	0.74		
门14+公社好	196.2	0.73			1.36	0.88		

中心,因此线粒体杂种优势所反映的主要应该是杂种的生长优势。在进行广泛的大田试验之前,可以利用它来初步评价杂种 F_1 的生长优势和产量潜力。这样可以把那些没有线粒体杂种优势的 F_1 种子不再进行田间产量观察,因而可以节省大量人力、物力和土地。这对于有些作物的育种工作是有实际应用价值的。

关于线粒体的互补作用,McDaniel 等曾报道优势杂种亲本线粒体在体外等比混合后,它的氧化活性、氧化磷酸化效率和呼吸控制都超过其亲本。显然线粒体体外互补与线粒体杂种优势的作用机理是不相同的,两者不应混淆。McDaniel 等对互补现象虽然提出种种解释但都很难令人信服。综合分析我们的研究数据并不能得出象 McDaniel 等人所作的结论。近年来国外很多科学工作者^[4,8]也未能肯定线粒体互补现象的存在,因此今后除对线粒体互补作用的真实性和普遍性继续进行验证外,还应在广泛研究杂种优势的生理生化基础上,寻找更多的

综合性的预测指标。

参 考 资 料

- [1] McDaniel, R. G. et al.: *Science* **152**, 1640, 1966.
- [2] McDaniel, R. G.: *Nature (New Biology)* **236**, 190, 1972.
- [3] Hobson, G. E.: *Biochem. J.* **124**, 10, 1971.
- [4] Ellis, J. R. S. et al.: *Nature* **241**, 45, 1973.
- [5] Zobe, R. G. et al.: *Plant Physiol.* **50**, 790, 1972.
- [6] Doney, D. L. et al.: *Euphytica* **24**, 387, 1975.
- [7] Van Gelder, W. M. J. et al.: *Euphytica* **24**(2), 421, 1975.
- [8] 萨基与巴拉巴斯: *Second International Winter Wheat Conference Proceedings*, p. 176, 1975. 转引自中国科学院遗传研究所:《国外遗传育种》, 1976年, 第9期 第41页。
- [9] 浙江农业大学植物生理教研组:《植物学报》, 1975年, 17卷, 第9期, 第250页。
- [10] 广东植物研究所生理生化研究室:《植物研究》, 1976年, 第4期, 第12页。
- [11] McDaniel, R. C.: *Seed Science & Technology* **1**(1), 25, 1973.
- [12] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.

[本文于 1977 年 8 月 29 日收到]

环化腺苷酸对两株人食管癌 上皮细胞作用的初步观察

章 静 波 葛 铭

(中国医学科学院林县食管癌防治研究队)

提 要

用环化腺苷酸 (cAMP) 或其衍生物二丁酰环化腺苷酸 (dbcAMP) 加茶碱 (theophylline) 处理两株长期培养的人食管癌上皮细胞。观察到细胞的生长增殖受到明显抑制, 细胞形态变得较为瘦长, 并难于被胰酶及 EDTA 混合液所消化。表明 cAMP 对人食管癌上皮细胞有一定“逆转”作用。

体外培养研究表明, cAMP 及其衍生物 dbcAMP 对病毒或化学致癌物转化的恶性细胞, 以及某些肿瘤细胞株(如神经母细胞瘤, 白血病等)有“逆转”某些恶性性质的作用, 诸如细胞形态的改变、生长速率的减缓、接触抑制的恢复、变得不易为胰酶所消化、以至生化机能的进一

步分化。因此 cAMP 以及与其代谢有关的某些药物不仅在体外培养里, 而且在动物实验中进行广泛的细胞学实验, 并试图用于肿瘤的治疗^[1]。

cAMP 及其衍生物对上皮性肿瘤细胞作用的报道甚少, 尤其对于成株的人癌细胞有否同