

# 光(温)敏核雄性不育水稻育性转换中幼穗和花药的某些生理指标变化

张明永 梁承邺 黄毓文 黎垣庆

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

## 摘要

光(温)敏核雄性不育水稻(Photoperiod/temperature-sensitive genic male-sterile rice, 简称P/TGMR) 8902s和培矮64s在秋季从不育阶段经半不育阶段向可育阶段转变进程中,对其花粉母细胞形成期(V)、花粉母细胞减数分裂期(VI)的幼穗和成熟花药(VIII)中过氧化物酶(Peroxidase, 简称POD)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, 简称SOD),和过氧化氢酶(Catalase, 简称CAT)活性测定表明,幼穗和花药相同发育时期的酶活性随正常花粉的比率升高而增加,但以成熟花药中增加最多,并伴有丙二醛(Malonaldehyde, 简称MDA)含量减少。表明自由基代谢的变化可能与光(温)敏核雄性不育水稻花粉败育有关,且自由基代谢变化在幼穗发育中期即已开始。

关键词: 雄性不育水稻; 自由基代谢; 育性转换; 幼穗分化

P/TGMR的不育基因的表达造成小孢子败育,致使小孢子形态结构、内含物和生理生化特征发生显著变化。<sup>[1]</sup> 早先研究表明, P/TGMR的小孢子败育,从花粉单核期到三核期,伴随着显著的膜脂过氧化作用,膜脂过氧化产物MDA含量明显增加, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、超氧阴离子自由基和有机自由基水平增高,低御活性氧损伤的保护酶SOD和CAT活性下降<sup>[4,5,6]</sup>。前人研究表明, P/TGMR的不育基因表达的敏感期在第二次枝梗原基分化期(III)至花粉母细胞减数分裂期(VI)<sup>[3]</sup>。然而对P/TGMR自由基代谢研究多集中在花药中,梅启明等<sup>[8]</sup>虽曾分析过P/TGMR幼穗分化期的SOD活性变化,但仅从单个酶的测定,未从代谢途径去分析。本文把自由基代谢与幼穗发育和育性转换联系起来,以探讨它们之间的关系。

## 材料与方 法

### 一、材料

P/TGMR 8902s和培矮64s分别由武汉大学朱英国教授和湖南杂交水稻中心罗孝和教授提供。8902s和培矮64s于1991年分别具有长达96d和133d的稳定不育期。8902s于10月18日的正常花粉率可达83.3%,培矮64s则于11月10日有67.3%的正常花粉率。

## 二、方法

1. 取材 将 8902s 和培矮 64s 分期播种, 幼穗抽出剑叶 1—3cm 时, 取花药用 I<sub>2</sub>-KI 压片镜检, 判断花粉育性。当花粉育性分别处于不育阶段 (不育花粉 > 99.0%) 半不育阶段 (可育花粉 1.1—49.9%) 和可育阶段 (可育花粉 > 50.0%) 时, 同时于不同播期材料中取处于花粉母细胞形成期 (V)、花粉母细胞减数分裂期 (VI) 的幼穗和成熟花药 (VIII) 进行有关生理指标测定。

2. 酶液提取 将幼穗、花药称重后, 按 1:2 (W/V) 加预冷的提取液 (0.1mol/L Tris-HCl pH8.0; 0.5mmol/L EDTA) 于冰浴中充分研磨, 12000xg 离心 10min, 取上清液作测定用。

### 3. 酶活性测定

(1) 过氧化物酶 (POD) 按罗广华等<sup>[7]</sup>的方法, 以每分钟增加 0.01 OD 值为一个酶活性单位。

(2) 过氧化氢酶 (CAT) 依蒋传英和王承德的方法<sup>[10]</sup>, 一个酶活力单位为每分钟减少 0.001 OD 值。

(3) 超氧化物歧化酶 (SOD) 按王爱国等<sup>[2]</sup>的方法, 测定 SOD 对氮蓝四唑 (NBT) 光化还原抑制作用, 以抑制 50% 的 NBT 光化还原为一个酶活性单位。

4. 丙二醛 (MDA) 含量测定 按 Heath 和 Packer<sup>[12]</sup>的方法。

以上 3、4 中各指标测定皆进行三次。

## 结果与分析

### 一、过氧化物酶 (POD) 活性

图 1 示 8902s 和培矮 64s 过氧化物酶在三个不同育性阶段, 以及各自阶段不同幼穗发育期的酶活性。可见, 由不育经半不育向可育阶段转换过程中, POD 活性表现为: 不育阶段 < 半不育阶段 < 可育阶段。以幼穗三个发育时期 (V、VI、VIII) 比较, 8902s 的不育阶段 POD 活性分别为可育阶段的 20.8%、21.7% 和 30.3%; 培矮 64s 则分别为 21.3%、10.6% 和 12.9%。在同一育性期内, 则是成熟花药 > V 期幼穗 > VI 期幼穗。

### 二、过氧化氢酶 (CAT) 活性

由图 2 可见在不同育性阶段, 无论 8902s 或培矮 64s 的 CAT 活性皆是不育阶段 < 半不育阶段 < 可育阶段。以幼穗三个发育期 (V、VI、VIII) 相比较, 8902s 不育期的 CAT 活性分别为可育期的 66.7%、7.7% 和 25.2%; 培矮 64s 则分别为 52.1%、9.4% 和 16.3%。在同一育性期内比较, 8902s 的 CAT 活性以成熟花药 > V 期幼穗 > VI 期幼穗。

### 三、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性

图 3 示 8902s 和培矮 64s 在不同育性阶段 SOD 活性的动态变化。在由不育向半不育再向可育阶段转换过程中, SOD 活性表现为: 不育阶段 < 半不育阶段 < 可育阶段, 表明随着可育花粉的增加, SOD 活性也随之升高。在幼穗三个相同发育时期 (V、VI、VIII) 中, 8902s 不育阶段的 SOD 活性分别为可育阶段的 45.8%、15.8% 和 33.8%; 培矮 64s 则分别为 9.4%、

2.7%和 35.5%。而在同一育性期内，两个参试不育系皆为成熟花药 > V 期幼穗 > VI 期幼穗。

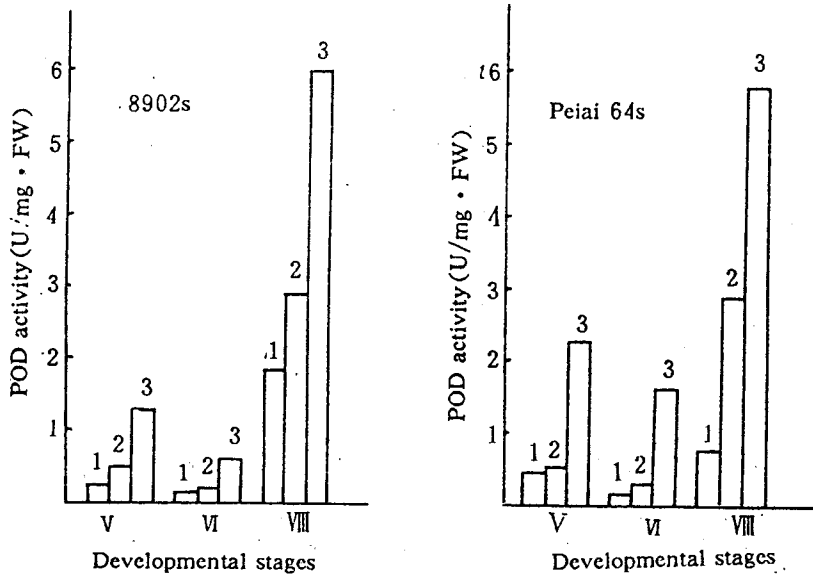


图 1 过氧化物酶活性在育性转换过程中的变化

Fig. 1 Changes of peroxidase activity in panicles and anthers of P/TGMR during transferring from sterile to fertile period  
 V 花粉母细胞形成期 Pollen mother cell formation stage  
 VI 花粉母细胞减数分裂期 Pollen mother cell meiosis stage  
 VIII 成熟花粉期 Mature pollen stage  
 1 不育阶段 Sterile period  
 2 半不育阶段 Semisterile period  
 3 可育阶段 Fertile period

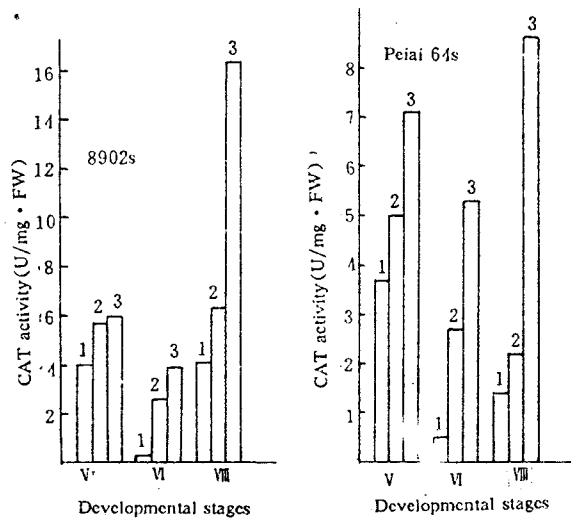


图 2 过氧化氢酶活性在育性转换中的变化

Fig. 2 Changes of catalase activity in panicles and anthers of P/TGMR during transferring from sterile to fertile period  
 图注如图 1. See note in Fig. 1

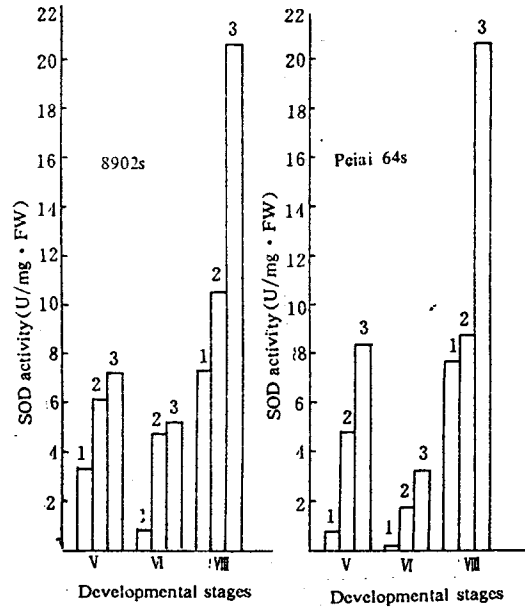


图 3 超氧物歧化酶活性在育性转换中的变化

Fig. 3 Changes of superoxide dismutase activity in panicles and anthers of P/TGMR during transferring from sterile to fertile period

图注如图 1. See note in Fig. 1

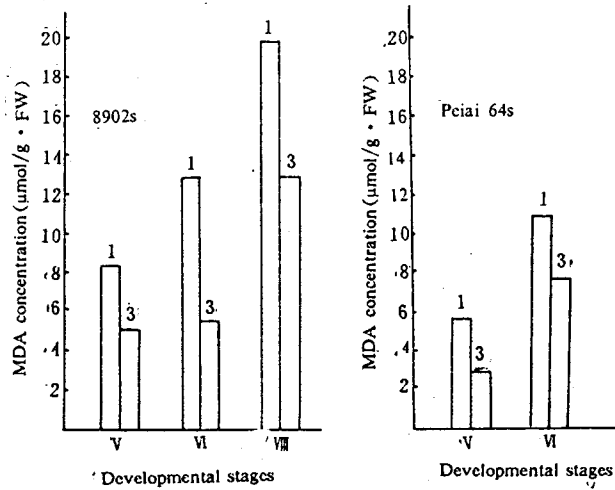


图 4 不育阶段与可育阶段幼穗和花药中丙二醛含量

Fig. 4 The content of malonaldehyde in panicles and anthers of P/TGMR in sterile and fertile period

图注见图 1 See note in Fig. 1

#### 四、丙二醛(MDA)含量

从图4可见,参试的两个P/TGMR的MDA含量均为不育阶段高于可育阶段,说明不育阶段幼穗和花药中,膜脂过氧化作用的加剧导致MDA积累。在幼穗发育三个时期,8902s的MDA含量为:成熟花药>VI期幼穗>V期幼穗;培矮64s缺VIII期数据,但VI仍高于V期幼穗。

## 讨 论

雄性败育的生理机制有激素失调、营养亏损等学说<sup>[9]</sup>,近来我们的工作表明,不育花药中的自由基代谢失调同花粉败育有关<sup>[4,5,6]</sup>。本文发现第V、VI期的幼穗中SOD、CAT、POD活性不育阶段已低于可育阶段,表明自由基代谢失调在幼穗发育中期即已开始。元生朝等<sup>[9]</sup>的研究表明,诱导P/TGMR育性转换的敏感期,在幼穗分化第二枝梗原基分化期(III)至花粉母细胞减数分裂期(VI),而不在幼穗发育后期。所以,我们推测,P/TGMR在进入诱导育性变化的敏感期后,感受外界长日照或高温后促使光(温)敏不育基因表达,引起体内包括自由基代谢在内的多种生理变化,从而造成小孢子发育受损,最终造成花粉败育。

$O_2^-$ 和 $H_2O_2$ 是具有很高生物活性的活性氧,参与许多生化过程,对有机体的结构和功能造成伤害。通常植物体内存在自由基产生与清除的平衡,而免除自由基对机体的毒害<sup>[11]</sup>。在不育条件下,P/TGMR幼穗中活性氧清除酶SOD、CAT、POD活性受到抑制,不能有效清除体内产生的自由基,造成自由基积累,从而对膜的不饱和脂肪酸的不饱和键攻击,致使膜脂过氧化作用加剧,造成不育幼穗中MDA含量升高,至直成熟不育花药中MDA含量达到最高。MDA的积累又可强烈地与细胞内各种成份发生反应,如与膜蛋白和酶分子发生聚合和交联<sup>[11]</sup>,破坏维持正常代谢的细胞区隔,致使代谢失控。从以上结果,我们认为P/TGMR花粉败育与不育花药内源活性氧的产生与清除系统的破坏有关,而且这种自由基代谢失调在幼穗发育中期即已开始。

## 参 考 文 献

- 1 王永锐,陈宏光.光敏核不育水稻花粉形态和育性稳定性及转换.中山大学学报(自然科学论丛),1989;8:44-49
- 2 王爱国,罗广华,邵从本等.大豆种子超氧化物歧化酶的研究.植物生理学报,1983;9(1):77-84
- 3 元生朝,张自国,许传桢.光照诱导湖北光敏感核不育水稻育性转变的敏感期及其发育阶段的探讨.作物学报,1988;14(1):7-13
- 4 陈贤丰,梁承鄞.HPGMR不育花药能量代谢, $H_2O_2$ 的积累与雄性不育的关系.植物生理学通讯,1991;(1):21-24
- 5 陈贤丰,梁承鄞.湖北光周期敏感核不育水稻花药能量和活性氧代谢.植物学报,1992;34(6):416-425
- 6 林植芳,梁承鄞,孙谷畴等.雄性不育水稻小孢子败育与花药的有机自由基水平.植物学报,1993;35(3):215-221
- 7 罗广华,王爱国,邵从本等.高浓度氧对水稻幼苗的伤害与活性氧防御酶.中国科学院华南植物研究所集刊,1989;4:169-176
- 8 梅启明,朱英国,张红军.湖北光敏核不育水稻中酶的反应特征研究.华中农业大学学报,1990;9(4):469-471
- 9 黄厚哲,楼士林,王候聪等.植物生长素亏损与雄性不育的发生.厦门大学学报(自然科学版),1984;23(1):82-97
- 10 蒋传英,王承德.工具酶活力测定.上海科学技术出版社,1982;36-38
- 11 Fridovich I. The biology of oxygen radical. Science, 1978; 201: 875-880
- 12 Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys. 1968; 125: 189-198

# SOME PHYSIOLOGICAL CHARACTERS IN PANICLES AND ANTHERS OF PHOTOPERIOD/TEMPERATURE-SENSITIVE GENIC MALE-STERILE RICE (P/TGMR) DURING TRANSFERRING FROM STERILITY TO FERTILITY

Zhang Mingyong Liang Chengye Huang Yuwen Li Yuanqing

(*South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650*)

## Abstract

The activity of peroxidase, catalase, superoxide dismutase and the content of malonaldehyde in panicles and anthers of P/TGMR 8902s and Peiai 64s were analysed at three different developmental stages (pollen mother cell formation, V; pollen mother cell meiosis, VI; and mature anther, VIII) during transferring from sterility to fertility. The results showed that the activity of the three enzymes in fertile period were higher than that in sterile period. In addition, the content of malonaldehyde decreased with the increasing rate of normal pollens. It is concluded that the changes of activated oxygen metabolism in panicles and anthers of P/TGMR may be related to pollen abortion in P/TGMR.

**Key words:** Male sterile rice; Free radical metabolism; Fertility transferring; Panicle differentiation