

# 光周期诱导光敏感核不育水稻花药蛋白变化的研究

张建华 林植芳 孙谷畴\* 林桂珠 梁承邨

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

## 摘 要

采用双向电泳技术对不同光周期条件下, 光敏感核不育水稻(农垦 58s)的可育与不育花药蛋白的变化进行分析, 发现花粉发育的不同阶段中, 不育花药具有四个特异蛋白 pI 6.2/MW 70KD, pI 6.2/MW 68KD, pI 6.2/MW 38KD 和 pI 7.4/MW 37KD。对游离组蛋白的分析表明, 长日照诱导的不育花药中游离组蛋白的相对百分率均明显低于短日照下的可育花药。据此推测长日照诱导不育花药蛋白质组成和代谢变化。不育花药中游离组蛋白含量低, 可能受 DNA 合成数量少的影响。

关键词: 光敏感核不育水稻; 花药蛋白; 光周期诱导; 游离组蛋白; 双向电泳

光敏感核不育水稻 (HPGMR) 农垦 58s 育性基因的表达主要受光周期的调控, 在长日照下不育, 短日照下可育。日照长度诱导育性转换的敏感期为二次枝梗原基分化期至花粉母细胞形成期<sup>[5]</sup>。有关光敏核不育水稻雄性不育机理, 国内已从遗传、生理生化、形态学等多方面进行了探讨, 得到了一些有意义的结果。然而, 深入地从分子水平上阐明雄性不育基因表达及其调控的研究不多<sup>[9]</sup>。

近年来, 一些研究者对 HPGMR 农垦 58s 的种子、幼穗<sup>[13]</sup>、胚乳<sup>[15]</sup>、叶片及叶绿体蛋白质<sup>[2,3,6]</sup>进行电泳分析, 发现在长日条件长成的不育株与短日条件出现的可育株, 或与正常的农垦 58 品种可育株相比, 不育株存在特异蛋白质。可是, 与育性变化直接相关的雄性器官花药及其中的花粉是否有相应的特异蛋白, 花粉中核蛋白的重要组分游离组蛋白的变化与花粉发育与败育的关系如何, 迄今尚未见到报告。我们以前已从花粉的自由基代谢、膜脂过氧化、能量代谢等初步阐明 HPGMR 不育性表达过程的生理生化机制<sup>[10,11]</sup>。本文进一步以典型的 HPGMR 农垦 58s 为材料, 比较其在不同光周期诱导下产生的不同育性表达过程中花药全蛋白和游离组蛋白的差异, 为阐明蛋白质代谢及调节与光周期诱导雄性不育关系提供新的证据。

## 材料和方法

**植物材料** HPGMR 农垦 58s (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*, Nongken 58s) 由本所遗传室提供。种子分期播种, 盆栽。4—5 叶期作 9h 短日照处理至二次枝梗原基分化期。然后将其

国家 863 项目资助课题

\* 索取单行本联系人

1993-10-26 收稿; 1994-04-09 修回

分成两组分别进行 9h 短日照和 14h 长日照处理至花粉母细胞形成期。长日照组每天下午 17:30 至 21 时补充光照,光源为两盏 200W 白炽灯。短日照组则从 17:30 开始,用两层黑布遮光,以保证获得可育和不育株。按丁颖<sup>[1]</sup>划分的标准确定水稻幼穗发育时期。花粉发育阶段则根据 Satake 提出的方法<sup>[20]</sup>,通过压片镜检加以区别。依次采集花粉单核早期、单核晚期、二核期及三核期的花药。

育性鉴定以套袋自交结实率为主要衡量标准,辅以花粉的 KI-I<sub>2</sub> 染色检查。

**花药全蛋白的制备** 花药加 10 倍 (W/V) 的 10% TCA 和 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇的丙酮溶液研磨,振荡 10min,置于 -20℃ 静置 1h 后,20000 $\times$ g 离心 20min。沉淀用预冷的含 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇的丙酮溶液洗涤 1 次,离心,真空干燥后贮于 -20℃ 待用。电泳分析前将样品蛋白溶于等电聚焦样品缓冲液中 (2% NP-40, 9.5mol/L) 脲素, 1.6% pH 5-8 两性电解质, 0.4% pH3.5-10 两性电解质, 5% 巯基乙醇), 10000 $\times$ g 离心 5min, 上清液中用于点样。蛋白质含量以考马斯亮蓝 G-250 测定<sup>[8]</sup>。

**双向电泳** 参照 O'Farrell<sup>[9]</sup>的方法。第一向电泳——等电聚焦电泳:采用圆盘式电泳,胶管 100 $\times$ 2.5mm。预电泳后每管加 100 $\mu$ g 蛋白,先经 400V 稳压电泳 16h,再升高至 800V 电泳 1h。取出胶条后在 SDS 样品缓冲液中平衡 30min。第二向电泳——SDS-PAGE:采用双板垂直式,胶板 140 $\times$ 140 $\times$ 1.2mm。分离胶含 14% Acry, 0.39% MBA 0.1% SDS, 0.375 mol/L Tris-Hcl 缓冲液 pH8.8。每 ml 胶液中尚需加入 10% AP, 3.3 $\mu$ l, TEMD 0.5 $\mu$ l。浓缩胶含 4.4% Acry, 0.12% MBA 0.1% SDS, 0.125 mol/L Tris-Hcl 缓冲液 pH6.8, 按每 ml 胶液量加入 3 $\mu$ l 10% AP 和 1 $\mu$ l TEMD。电极缓冲液为 0.192mol/L 甘氨酸, 25 mmol/L Tris-Hcl 和 0.1% SDS, 每块板以 18mA 稳流电泳。蛋白质图谱依蔡晓丹等人的方法作银染染色<sup>[15]</sup>。标准蛋白包括磷酸化酶 B (94 000)、牛血清白蛋白 (67 000)、肌动蛋白 (43 000)、碳酸酐酶 (30000) 和烟草花叶病毒外壳蛋白 (17 500), 以标准蛋白在 SDS 相中电泳作为参照物,确定样品蛋白的分子量。将等电聚焦电泳后的另一些胶条切成 1cm 长小段,分别浸泡于 2ml 抽气的重蒸馏水中振荡过夜,测定各浸出液的 pH 值,以 pH 值对胶条长度绘制标准曲线。据此求样品谱带的等电点。

**游离组蛋白的分析** 取花药 100—300mg,加 10 倍的  $\beta$ -丙氨酸-冰醋酸缓冲液 pH4.5 研磨,2 000 $\times$ g 离心 15 min,上清液作电泳用。圆盘式电泳采用 pH4.3 15% Acry 凝胶系统,电极缓冲液为  $\beta$ -丙氨酸-醋酸<sup>[13,16]</sup>。电泳后以 12.5% TCA 固定,考马斯亮蓝 R-250 染色,甲醇-冰醋酸脱色, Cs-910 双波长薄层扫描记录电泳谱带的变化。

## 实验结果

### 一、不同光周期下花药蛋白质图谱的变化

采用双向电泳结合灵敏的银染显色,可从花药中分辨出约 180 个蛋白质斑点。这些蛋白质主要集中于等电点 (pI) 5.2—7.0,分子量 (MW) 30—90KD 的区域 (图 1—4)。

比较不同光周期处理的农垦 58s 花粉不同发育期的花药的蛋白质双向电泳图谱,从图 1 可见,花粉发育单核早期时,不育花药和可育花药的蛋白质图谱已出现明显的差异。不育花药的蛋白比可育花药的蛋白多 4 个蛋白点,即 P<sub>1</sub> (pI 6.2, MW 70KD), P<sub>2</sub> (pI 6.2, MW

38KD), P<sub>3</sub> (pI 7.4, MW 37KD) 和 P<sub>7</sub> (pI 6.2, MW 38KD)。花粉的单核晚期时, 相应的不育花药中同样观察到上述4个特有的蛋白质(图2)。

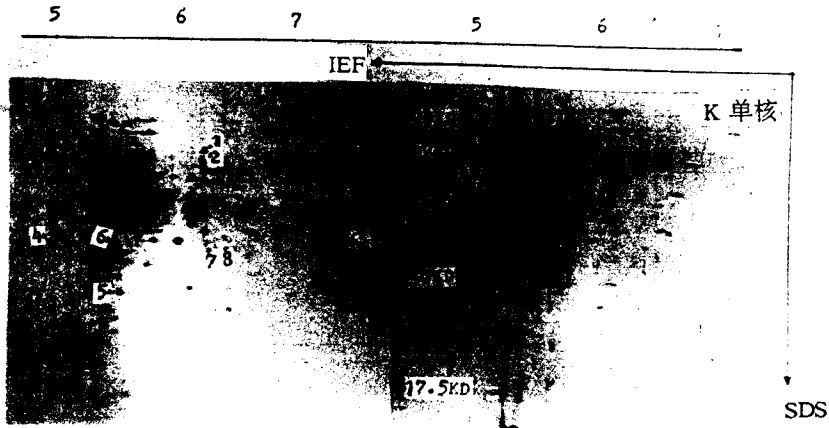


图1 花粉单核早期花药蛋白质的双向电泳图谱

Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis of anther protein at the early uninucleate stage of pollen 左 (Left): 不育花药 (Sterile) 右 (Right): 可育花药 (Fertile)

图2-5的左、右同图1 Fig. 2-5 left, right same as in Fig. 1

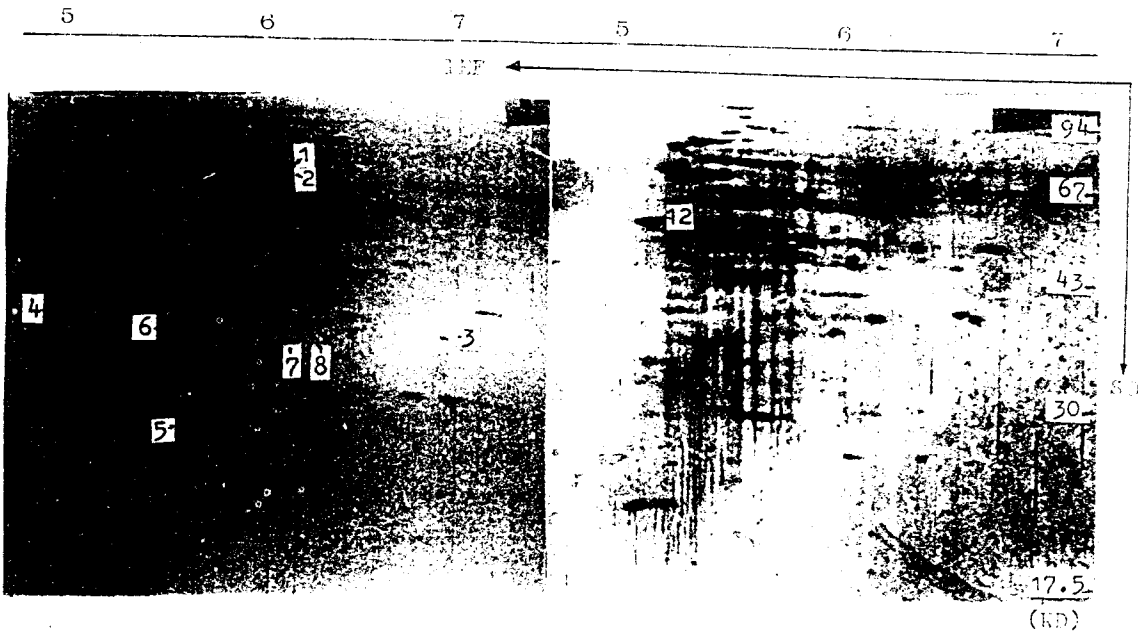


图2 花粉单核晚期花药蛋白质的双向电泳图谱

Fig. 2 Two-dimensional electrophoresis of anther protein at late uninucleate stage of pollen

图3为花粉二核期的花药蛋白质图谱, 其中, 不育花药中除在花药单核期已出现的P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>和P<sub>7</sub>仍继续存在外, 还看到另一个新的蛋白点P<sub>9</sub> (pI 6.5, MW 38KD)。不育花药中P<sub>6</sub> (pI 5.7, MW37KD)的pI较可育花药中的P<sub>6a</sub> (pI 5.5, MW 38KD), 略偏向碱性; 且分子量略变小。在图谱上的斑点亦较淡。花粉三核期时, 不育花粉的蛋白质增加 (pI 7.7, MW

37KD) 的组分 P<sub>11</sub> (图 4)。

图 5 概括地指出花粉发育过程中不育与可育花药中蛋白质组分与数量消长变化较显著的 12 个蛋白质。除了上述各点的存在与否外 (图 1—4), 不育花药中的 P<sub>4</sub> (pI 5.0, MW 38KD), P<sub>5</sub> (pI 5.5, MW 25KD), P<sub>7</sub> (pI 6.2, MW 70KD), P<sub>9</sub> (pI 6.5, MW 38KD), P<sub>10</sub> (pI 6.25, MW 32KD) 的染色强度随花药发育进程而有变深的趋势。可育花药中这几个蛋白的色泽却几乎无变化。但是, 可育花药中的 P<sub>12</sub> (pI 5.4, MW 56KD) 斑点较大、颜色较深, 不育花药中则色淡, 甚至消失。

上述结果表明, 不育花药中 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> 和 P<sub>7</sub> 4 个蛋白可能是直接与花药不育性有关的特异组份。而 P<sub>4-5</sub>, P<sub>8-11</sub> 等的消长情况则可能与花粉的败育有关。

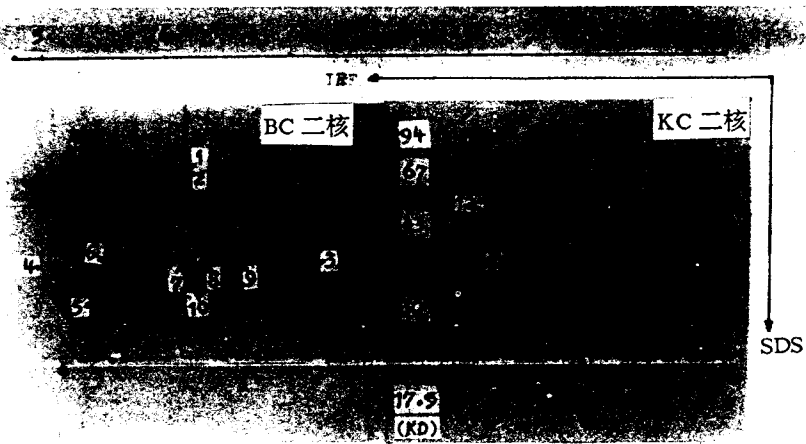


图 3 花粉二核期花药的蛋白质图谱

Fig. 3 Protein map of anthers at the dinucleate stage of pollen

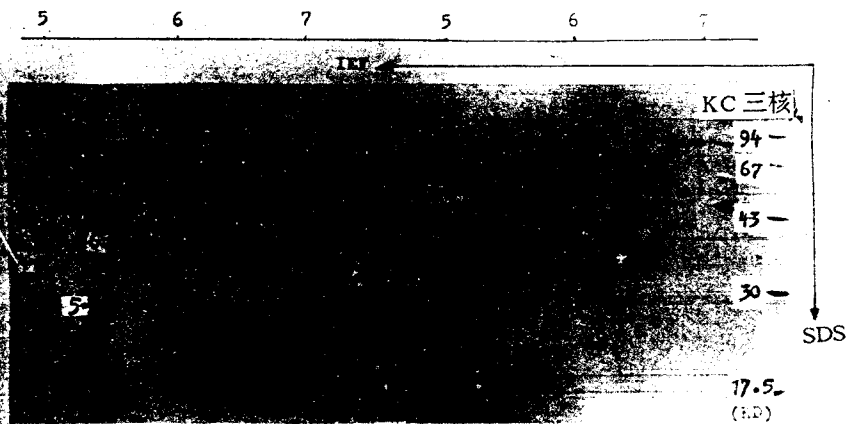


图 4 花粉三核期花药的蛋白质图谱

Fig. 4 Protein map of anthers at the trinucleate stage of pollen

## 二、花药中游离组蛋白的变化

花粉不同发育时期花药中的游离组蛋白共由 15—17 条谱带组成 (图 6—8)。第 3、5、6 和 15 带为不育花药游离组蛋白的主要成份; 在可育花药中, 除第 3、5、6 和 15 带外, 在二核花粉期后尚有第 7 带为主带。

花粉单核期不育花药和可育花药的 15 条带均明显地较其它带强。可育花药尚有第 16 和 17 两条带, 但 11—13 带不如不育花药的清晰 (图 6)。二核花粉期, 两种花药中分子量较大的谱带明显减弱, 其中第 15 带最显著。第 11—17 条中, 除第 12、13 和 15 带尚可见外, 其它带则近于消失。可育花药第 6 带见增强, 并出现第 7 带; 而不育花药的 5—7 带变化不大, 第 15 带虽有减弱, 却仍较可育花药的同一带强 (图 7)。

三核花粉期的可育花药, 第 12、13 和 15 带虽仍可见, 但已明显减弱, 第 14 带已消失。第 6 带亦见减弱, 而第 7 带则明显增强。不育花药的 12 与 15 带虽较二核期变弱, 但仍清晰 (图 8)。

结果表明, 在花粉发育过程中, 游离组蛋白的不同组分, 在可育与不育花药中有不同的消长规律, 变动较明显的有第 6、7 和 15 带。可育花药中分子量较大的谱带随花粉发育而减弱, 以至消失 (如第 11 和 14 带)。分子量较小的第 6 和 7 带则逐步增强。二核期以第 6 带为主, 三核期以第 7 带为主。不育花药在花粉发育后期仍保持分子量较大的组分 (如第 12、13 和 15 带), 且第 8—11 带, 在不育花药的二核花粉期仍较明显, 而可育花药则明显减弱。

在花粉发育的单核和二核期, 可育花药的游离组蛋白分别较不可育花药高 19.6% 和 7.4%。

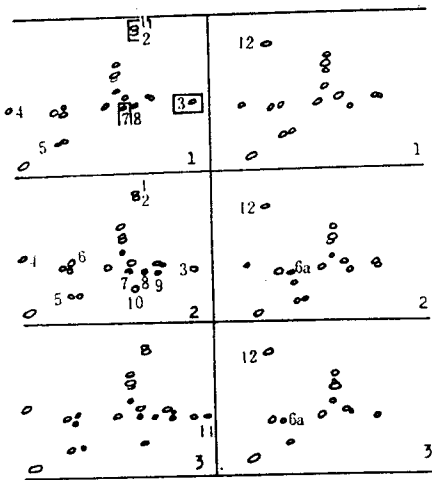


图 5 不同发育时期花粉中 12 个主要蛋白质的变化  
Fig. 5 Changes of 12 main protein spots P<sub>1</sub>-P<sub>12</sub> in anthers at different stages of pollen development

1、2、3 分别为单核、二核和三核花粉期  
1, 2, 3, uni-, di-, and tri-nucleate stage

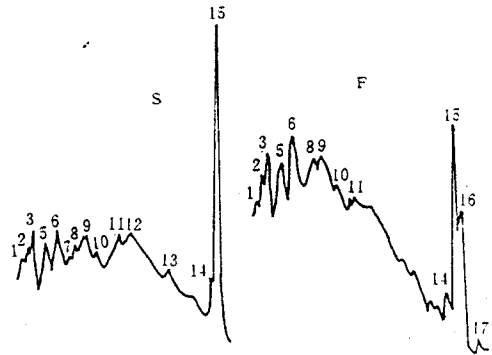


图 6 单核花粉期花药游离组蛋白的扫描图  
Fig. 6 The scanning photograph of free histone from sterile (S) and fertile (F) anthers at uninucleate stage of pollen

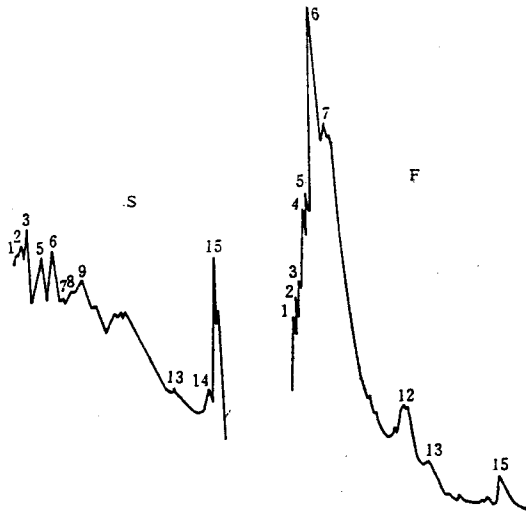


图7 二核花粉期花药游离组蛋白的扫描图

Fig. 7 The scanning photograph of free histone from sterile and fertile anthers at dinucleate stage of pollen

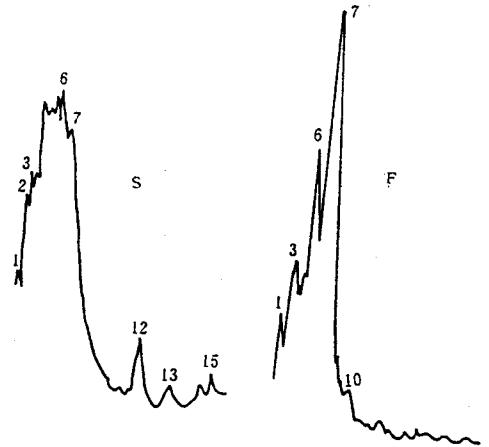


图8 三核花粉期花药的游离组蛋白扫描图

Fig. 8 The scanning photograph of free histone from sterile and fertile anthers at trinucleate stage of pollen

## 讨论

长日照诱导 HPMGR 水稻雄性不育,光的信号可能主要来自叶片<sup>(3)</sup>,花粉仅是最终的效应部分<sup>(4)</sup>。显然对花粉本身的研究更能直接反映光谱诱导不育基因的表达。前人关于光敏核不育材料中存在特异蛋白的结论,大多以非性器官为对象,且多是通过不育农垦 58s 与可育常规品种农垦 58 相比较而得出的。由于迄今尚没有确切的研究证据表明农垦 58s 源自农垦 58 的自然突变。据我们初步观察,自然杂交造成农垦 58s 的可能性仍较大,因而选用农垦 58 作为可育对照时,难以排除由于双方遗传背景差异大的干扰。本文利用不同光周期诱导同一基因型的农垦 58s 育性转变为不育与可育进行对比,从雄性器官中发现 4 种特异蛋白,进一步提供了光敏核不育基因表达产生特异蛋白的证据。

花药中的蛋白除了少量采自花药囊壁外,大部分皆为花粉蛋白。因此,不育花药的特异蛋白主要代表花粉蛋白的特异组分。4 个特异蛋白的分子量 (37, 38, 68, 70KD) 与其它材料来源的特异蛋白分子量有别,如农垦 58s 的叶绿体特异蛋白为 45KD 和 61KD<sup>(3)</sup>。这可能与器官种类,甚至对双向电泳技术与样品制备掌握程度的不同有关。

与光周期敏感的不育性有关的花药蛋白的特异组分的来源、特性和功能如何,目前尚不清楚。有关“热激蛋白”的研究中一般认为,50KD 以上的蛋白具有结构蛋白的功能,50KD 以下的主要是调节蛋白<sup>(7)</sup>。据此,我们推测不育花药中 68KD 和 70KD 的两个特异蛋白可能是结构蛋白,而另两个 37—38KD 的蛋白则可能起调节作用。从花粉不同发育期中出现数量消长变化的另外 8 个蛋白点的分子量看来,其中 3 个点也在 37—38KD 之间,仅等电点不同而已。这

部分蛋白是否为某一个酶的带不同电荷的同工酶, 仍有待深入的研究。

植物花粉发育过程中, 基因表达的数量很多<sup>[17]</sup>, 而仅有其中部份基因表达产物 (mRNA) 可在花药内检测到, 其它器官并不存在。由此可见, 花粉发育过程中涉及花药内特异表达的基因数目十分多。当雄性小孢子发育受阻, 必然导致一系列代谢过程发生变化。其因果关系仍难以判断, 有待进一步研究。

组蛋白是核蛋白的重要组成成分, 常以盐键与核酸相结合, 起着核基因调节剂的作用。细胞质雄性不育的高粱与水稻花药中游离组蛋白含量下降<sup>[4,14,17]</sup>。本文中, 在单核和二核花药期, 光敏核不育水稻不育花药的游离组蛋白较可育花药低, 表明不同遗传背景的不育性表达有相似之处。通常组蛋白有5种组分, 如 H<sub>1</sub>, H<sub>2A</sub>, H<sub>2B</sub>, H<sub>3</sub> 和 H<sub>4</sub>, 其中 H<sub>2A</sub>, H<sub>2B</sub>, H<sub>3</sub> 和 H<sub>4</sub> 各2个分子组成八聚体的核小体, DNA 围绕其上; 而组蛋白 H<sub>1</sub> 结合在连接核小体之间的 NDA 间隔区, 细胞内组蛋白与 DNA 的比例则较为稳定, 约为 1:1 (重量比)<sup>[18]</sup>。因此, 不育花药中游离组蛋白相对含量较可育花药低, 可能是受不育花药内 DNA 合成数量少的影响, 从而导致小孢子发育受阻和代谢过程的变化。

### 参 考 文 献

- 1 丁颖. 中国水稻栽培学. 农业出版社, 1961; 81—85
- 2 王台, 肖翊华, 刘文芳. 光周期诱导叶蛋白变化的研究. 华中农业大学学报, HPGMR 专号, 1990; 9 (4): 355—362
- 3 王台, 童哲. 光周期敏感核不育水稻叶绿体的特异性蛋白质. 植物学报, 1992; 31 (6): 426—431
- 4 王延枝. 同核异质水稻雄性不育花粉发育过程中生化特征的初步研究. 武汉大学学报, 1985; 2: 81—87
- 5 元生南, 张自国, 许传楨. 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
- 6 白书农, 谭克辉. HPGMR 材料特异蛋白的发现. 中国植物生理学会第五次全国会议论文摘要, 1989; 245
- 7 刘德立. 高分子量热激蛋白及其功能. 农业生化通讯, 1991; 6 (2): 1—9
- 8 李琳, 焦新之. 应用蛋白染色剂考马斯亮蓝 G—250 测定蛋白质的方法. 植物生理通讯, 1990; 5 (6): 52—55
- 9 陈宏光, 吴涛, 梁卫文, 彭业芳. 光敏核不育水稻的研究动态. 中山大学研究生学刊, 1988; 9 (3): 84—92
- 10 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的代谢. 植物学报, 1992; 34 (6): 416—425
- 11 林植芳, 梁承鄞, 孙谷畴, 林桂珠. 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
- 12 曹以诚, 傅彬英, 王明全, 朱英国. 光敏感核不育水稻蛋白质双向电泳的初步研究. 武汉大学学报, HPGMR 专利, 1987; 7: 70—80
- 13 彭永康, 祁志占, 张福跃, 宁玖雪, 刘桂琴. 高粱雄性不育与可育花药同工酶及游离组蛋白的比较研究. 实验生物学报, 1991; 24 (3): 241—248
- 14 舒群芳, 王苏生. 雄性不育水稻胚乳蛋白的双向电泳分析. 遗传, 1989; 11 (3): 5—8
- 15 蔡晓丹, 王理开, 徐晓利. 一种改良的蛋白质双向电泳银染法. 生物化学与生物物理进展, 1986; 3: 66—68
- 16 戴尧仁, 孙振荣, 徐月荣等. 水稻二九南一号雄性不育系及其相应保持系花药中某些呼吸酶和游离组蛋白的比较研究. 遗传学报, 1978; 5: 227—231
- 17 Alberts B, Bray D et al. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing Inc. 1989; 552—609
- 18 Metzler DC. Biochemistry. New York: Academic Press, 1977; 988
- 19 O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. J Biol Chem. 1975; 260: 400—4021
- 20 Satake T. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore in rice plant. IX. Revision of classification and terminology of pollen development stage. Process Crop Soc Japen. 1974; 43 (1): 31—35

## STUDY ON CHANGES OF PROTEIN IN ANTHERS OF PHOTOPERIOD-SENSITIVE GENIC MALE-STERILE RICE DURING PHOTOPERIODIC INDUCTION

Zhang Jianhua    Lin Zhifang    Sun Guchou\*    Lin Guizhu    Liang Chengye

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

### Abstract

The changes of anther proteins in a typical Hubei photoperiod-sensitive genic male-sterile rice (HPGMR) Nongken 58s under the induction of long day (14/10h, light/dark) and short day (9/15h, light/dark) were analysed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins from anthers were resolved into 180 components. The protein electrophoretogram showed that there were evident difference between sterile anthers and fertile anthers at different stages of pollen development. Four of the protein spots, namely P<sub>1</sub> (70KD, pI6.2), P<sub>2</sub> (68KD, pI6.2), P<sub>3</sub> (37KD, pI7.4) and P<sub>7</sub> (38KD, pI6.2) were observed in sterile anthers from early uninucleate stage to trinucleate stage of pollen. These proteins were considered as the specific proteins related to sterility formation under long day induction.

Free histone was also analysed by SDS—PAGE in anthers. It showed that the histone patterns were changed with the development of pollen, and the relative contents of free histone in sterile anther were lower than that in fertile anther by 19.6% and 7.4% at the uni- and dinucleate stages of pollen. The decrease of part of free histone content may be caused by the effects of decreasing amount of synthetic DNA in the sterile anthers.

**Key words:** Hubei photoperiod-sensitive genic male-sterile rice; Anther protein; Photoperiodic induction; Free histone; Two-dimensional electrophoresis