

水稻雄性不育与花药中类脂褐素的积累

王恒明 梁承邨 林植芳 黄毓文

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 细胞质雄性不育水稻不育系珍汕 97A 和其保持系珍汕 97B, 处于不育期的光(温)敏核不育水稻 W6154s 和培矮 64s 的花药中类脂褐素(LFLP)含量随花粉发育或败育而增高。不育花药中 LFLP 的形成速率比可育花药快, 三核期的珍汕 97A 和不育期 W6154s 的花药, 其 LFLP 比相应具育性花药高 24%。用抗氧化剂 GSH、BHT 和 N_2 处理离体的单核期花药, 发现 GSH 可降低珍汕 97A 和不育期的 W6154s 的 LFLP 含量。结果认为, 水稻雄性不育与膜脂过氧化作用的荧光产物类脂褐素的积累有关。

关键词 细胞质雄性不育水稻; 光(温)敏核不育水稻; 类脂褐素; 抗氧化剂

THE MALE-STERILITY OF RICE AND ACCUMULATION OF LIPOFUSCIN-LIKE PIGMENTS IN ANTHERS

Wang Hengming Liang Chengye Lin Zhifang Huang Yuwen

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

Abstract The changes of lipofuscin-like pigment(LFLP) content in anthers of male-sterility rice were studied for examining the possible lipid peroxidative damage in relation to male-sterility.

During the pollen development from uninucleate to trinucleate stages, LFLP contents in fertile and sterile anthers all increased gradually to different extents in the tested cytoplasmic male-sterile line rice Zhenshan 97A and its maintainer Zhenshan 97B, the photoperiod (temperature) -sensitive genic male-sterile rice W6154s and Peiai 64s. The LFLP content and accumulative rate in both types of male-sterile rice were higher than those in fertile anthers. In trinucleate stage, the sterile anthers from Zhenshan 97A and W6154s showed 24% higher LFLP content than their fertile anthers. From uninucleate to trinucleate stages of pollen, the average accumulative rates of LFLP in sterile and fertile anthers were 41% and 26% per stage, respectively.

When the isolated fresh anthers at uninucleate and trinucleate stages were treated by using N_2 and antioxidants glutathione (reduced) and butylated hydroxytoluene, the LFLP content was partially reduced by glutathion treatment at uninucleate stage. The results indicated that the expression of male-sterility of rice was associated with the accumulation of a

fluorescent product of lipid peroxidation, lipofuscin-like pigments.

Key words Cytoplasmic male-sterile rice; Photoperiod (Temperature) -sensitive genic male-sterile rice; Lipofuscin-like pigments; Antioxidant

类脂褐素 (Lipofuscin-like pigments, LFLP) 是由膜脂过氧化作用产物与细胞内的蛋白质、核酸和磷脂交联形成的一种带 Schiff 碱基的荧光性化合物^[1]。迄今对植物 LFLP 的为数不多的研究主要见于衰老方面。Maguire 和 Harrod 于 1975 年首次提出了香蕉和桃子果实成熟及衰老过程中有 LFLP 积累的论点^[2]。此后, Wilhelm 和 Wilhelms 报道菜豆老叶中也有 LFLP 的积累^[3]。林植芳等发现采后荔枝果实中积累了丙二醛 (MDA) 与 LFLP, 同时伴以超氧化物歧化酶活性下降和还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 等抗氧化剂的减少^[4,5]。王伟等观察到玉米、水稻和苋菜衰老叶片的叶绿体中 LFLP 含量显著增大, 加入 MDA 可诱致幼叶叶绿体中 LFLP 的迅速形成, 而 α -生育酚则能抑制 LFLP 的形成^[6]。孙谷畴等用 ABA 处理成熟的水稻和玉米叶片, 使其加速衰老, 也发现 ABA 引起叶片 LFLP 荧光激发峰 360nm 和发射峰 460nm 明显增高^[7]。这些研究均认为 LFLP 的积累与植物器官的年龄有关, 是衰老时膜脂过氧化作用加剧所致。

近年来, 我们对水稻雄性不育的生理生化机理的研究表明, 不育水稻小孢子的败育伴随着活性氧 (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$), 有机自由基和 MDA 含量增高, 具抗氧化作用的保护酶类活性下降, 显示明显的自由基代谢失衡的现象^[8-11]。然而, 作为膜脂过氧化作用的次生产物 LFLP 与小孢子的发育与败育的关系如何? 雄性不育过程是否有 LFLP 的积累, 其动态如何? 尚未有直接的实验证据。本文探讨了细胞质雄性不育与光(温)敏不育水稻花药不同发育阶段的不同育性花药中 LFLP 含量的变化及 N_2 与抗氧化剂对 LFLP 的影响, 为阐明雄性不育与自由基损伤关系提供新的依据。

1 材料和方法

实验材料 细胞质雄性不育水稻 (Cytoplasmic male-sterile, CMS) 为不育系珍汕 97A 及其保持系珍汕 97B。光(温)敏核不育水稻 [Photoperiod (Temperature)-sensitive genic male sterile, P(T)GMS] 选用 W6154s 和培矮 64s。秋季大田种植, 大田管理按常规。

花粉发育期的确定 取小穗中部花药, 压片, I_2 -KI 染色镜检, 参照 Satake 的方法^[12] 确定花粉发育期。取单核期、二核期和三核期的花粉分析 LFLP。光(温)敏核不育材料的可育期和不育期依育性转换过程中可染花粉率为准。

花药处理 单核期与三核期的可育与不育花药 100mg 密闭于小瓶中, 充 N_2 2h, 或用抗氧化剂 GSH (Glutathione, 还原型谷胱甘肽, 5mmol/L) 和 BHT (Butylated hydroxytoluene, 2,6-二丁基甲酚, 5 μ mol/L) 溶液浸泡 4h。

LFLP 的提取与含量测定 参照 Wilhelm 和 Wilhelms^[3] 及 Fletcher 等^[13] 的方法提取 LFLP, 略加修改。100mg 花药以氯仿-甲醇 (2:1, v/v) 研磨提取, 定容到 5ml, 暗下低温 (5 $^{\circ}C$) 放置 1h, 随后以 1000xg 离心 10min, 氯仿层在暗下减压干燥, 加甲醇-氯仿 (8:1, v/v) 溶液溶解, 定容 2ml。吸取此液 0.4ml, 以同一溶剂稀释到 5ml。LFLP 的荧光以 Hoefer TKO100 荧光计测定, 激发光波长 350nm, 发射光 460nm。纯溶剂作空白对照, 0.1 μ g ml^{-1} 的硫酸奎宁 0.1 μ mol/L H_2SO_4 液作荧光校准。LFLP 含量以相对荧光吸收值 $A_{460nm} mg^{-1}$ 花药表示。

2 实验结果

2.1 雄性不育水稻花粉不同发育阶段的花药 LFLP 含量的变化

细胞质雄性不育系珍汕 97A 和其保持系珍汕 97B 花药的 LFLP 含量皆随花粉发育而增多。花粉单核期的花药较少 LFLP, 此时不育系与保持系花药的 LFLP 数值几无差别。二核期的 LFLP 显著增多, 三核期时可育花药的 LFLP 比单核期增加 32%, 不育花药则增加 61%(表 1)。比较不育花药与可育花药 LFLP 积累的动态, 可见不育花药 LFLP 的积累速率和实际含量皆明显高于可育花药, 因而在二核和三核期, 不育花药与可育花药的 LFLP 的比值也分别提高 15.6%、23%。这说明花粉正常发育成熟或败育, 皆伴以 LFLP 的增高; 不育花粉败育时, LFLP 的增高尤为明显。

表 1 CMS 水稻不育系和保持系花药中类脂褐素含量的变化
Table 1 Changes of lipofuscin-like pigments contents in anthers of CMS-line
Zhenshan 97A and Maintainer Zhenshan 97B

材料 Materials	单核期 Uninucleate		二核期 Binucleate		三核期 Trinucleate	
	A _{460nm}	mg ⁻¹ FW %	A _{460nm}	mg ⁻¹ FW %	A _{460nm}	mg ⁻¹ FW %
珍汕 97A Zhenshan 97A	63.3 ± 1.7	100.0	78.0 ± 2.8	123.2	102.0 ± 2.5	161.1
珍汕 97B Zhenshan 97B	63.0 ± 1.8	100.0	67.5 ± 5.6	107.1	83.0 ± 1.8	131.7
A/B	1.01		1.16		1.23	

光(温)敏不育水稻 W6154s 不育期(花粉败育 100%)和可育期(花药的可染率 65%)的单核花粉阶段, 花药的 LFLP 含量也相近, 随花粉发育(或败育), LFLP 增高, 不育花药与可育花药之间 LFLP 的比值到三核期增大了 23.6%, 此增幅值与表 1 中 CMS 水稻三核期的同项比值一致。培矮 64s 不育期(花粉败育达 100%)和可育期(可染花粉率 45%), 其二核期的可育或不育花药 LFLP 增幅分别为 13% 和 21%, 与 W6154s 的两种不同育性期材料的增幅相近, 但三核期时不育花药 LFLP 增幅(40%)低于 W6154s(78%)和 CMS 珍汕 97(61%), 故此发育时期的 LFLP 在两种育性花药之比并未增大(表 2)。可能这与培矮 64s 可育期之花粉可染率较低有一定联系。

表 2 P(T)GMS 水稻可育期和不育期花药中 LFLP 含量的变化
Table 2 Changes of Lipofuscin-like pigments contents in anthers of P(T)GMS
rice at fertile-period and sterile-period

材料 Materials	单核期 Uninucleate		二核期 Binucleate		三核期 Trinucleate	
	A _{460nm}	mg ⁻¹ FW %	A _{460nm}	mg ⁻¹ FW %	A _{460nm}	mg ⁻¹ FW %
W6154s						
不育期(S)	50.0 ± 1.8	100.0	69.0 ± 3.4	123.2	100.0 ± 1.4	178.6
可育期(F)	53.0 ± 3.4	100.0	62.0 ± 1.9	116.9	80.9 ± 2.2	152.8
S/F	1.06		1.11		1.24	
培矮 64s Peiai 64s						
不育期(S)	62.5 ± 3.4	100.0	75.5 ± 2.1	120.8	87.5 ± 3.0	140.0
可育期(F)	60.5 ± 0.6	100.0	68.5 ± 2.1	113.2	80.5 ± 1.3	133.1
S/F	1.03		1.10		1.09	

S — Sterile period; F — Fertile period

若将表1与表2中可育花药与不育花药的LFLP含量的平均相对%按花粉发育不同阶段作图,从图1可见两种类型雄性不育水稻的三种试验材料中,不育花药的花粉败育过程比可育花药中花粉的成熟显示较高的LFLP积累速率。单核期到三核期的可育花药中LFLP平均增加26%,相应的不育花药中LFLP平均增加41%。

2.2 N₂和抗氧化剂对雄性不育水稻花药LFLP积累的影响

对离体新鲜的花药进行充N₂或抗氧化剂GSH和BHT处理(图2-4),发现处理的CMS水稻珍汕97A和97B花药LFLP含量皆有所下降。单核期的下降率4-10%,三核期则为1-6%(图2)。差异显著性检验显示珍汕97A单核期花药经N₂,GSH和BHT处理,对LFLP积累的抑制效应达显著水平。珍汕97B单核期以GSH处理也有同样的效果。三核期处理的差异则不显著。

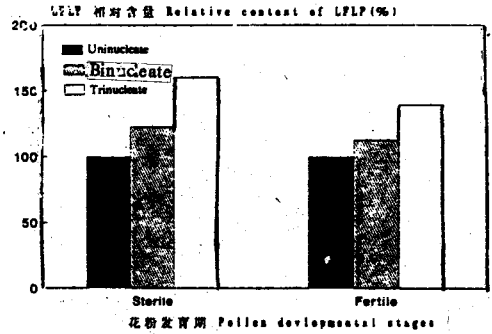


图1 不同育性花药中LFLP的积累与花粉发育阶段的关系

Fig. 1 The accumulation of lipofuscin-like pigments in relation to the developmental stages of pollen in anthers with different fertility

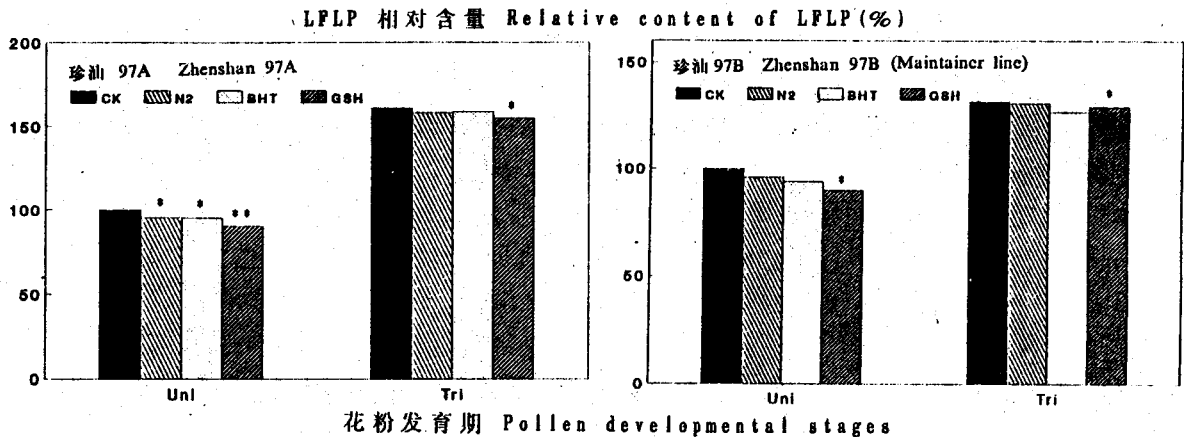


图2 抗氧化剂和N₂对CMS水稻花药LFLP积累的影响

Fig. 2 Effects of antioxidants and N₂ on the accumulation of lipofuscin-like pigments in anthers of CMS rice

* 示差异达显著水平, >0.05 level of significance

图3可见,P(T)GMS水稻W6154s在单核期和三核期经GSH、BHT和N₂处理,呈现与CMS水稻相似的变化。充N₂使LFLP含量比对照略低3.6%左右,而BHT和GSH则导致LFLP下降5-9%。但只有GSH对不育期的单核和三核花药,及BHT对可育期的单核花药的处理具显著的抑制效应。另一套P(T)GMS水稻培矮64s的LFLP受N₂和抗氧化剂抑制程度较小,下降幅度在1.6-5%之间,与对照的差别不显著。

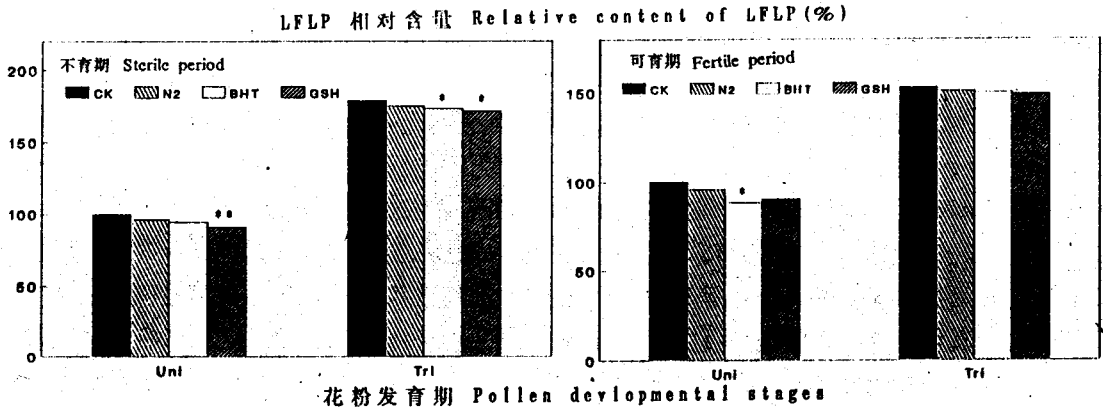


图 3 抗氧化剂和 N₂ 对 P(T)GMS 水稻 W6154s 花药 LFLP 积累的影响
 Fig. 3 Effects of antioxidants and N₂ on the accumulation of lipofuscin-like pigments in anthers of P(T)GMS rice W6154s

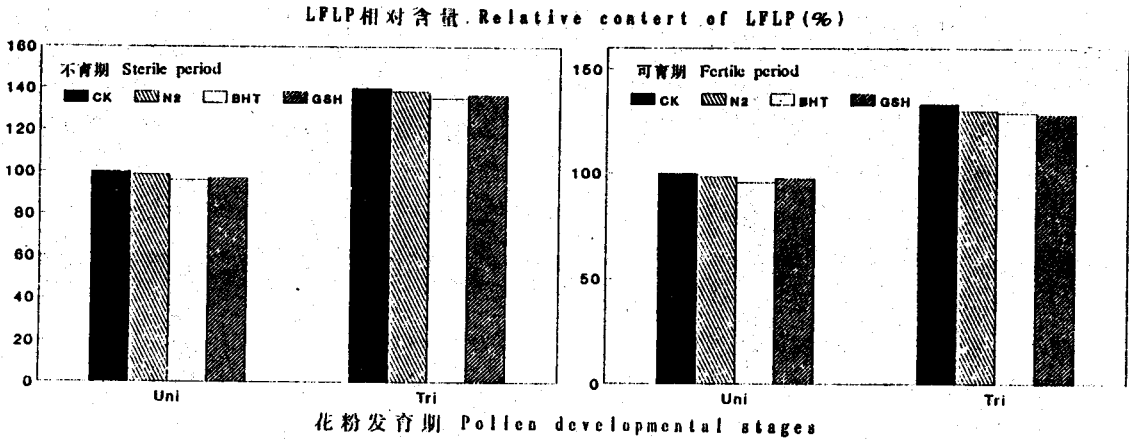


图 4 抗氧化剂和 N₂ 对 P(T)GMS 水稻培矮 64s 花药 LFLP 积累的影响
 Fig. 4 Effects of antioxidants and N₂ on the accumulation of lipofuscin-like pigments in anthers of P(T)GMS rice Peiai 64s

3 讨论

脂褐素(Lipofuscin)是动物的年龄色素, 沉积于皮肤和各种内脏, 为老年斑的重要组分。脂褐素的前体是含共轭键的羰基化合物^[1], 如 MDA 等。近二十年来, 植物器官中存在脂褐素类似物已为一系列工作所证实, 并将其与植物衰老时由自由基引起的膜劣变损伤相联系^[2-4, 6-7]。本文对雄性不育水稻花药 LFLP 的动态研究证明 LFLP 与花粉的正常发育成熟或不育花粉的败育皆有关系。花粉正常发育成熟过程 LFLP 逐渐增多, 不育花粉败育过程 LFLP 的形成速率和实际数值明显比同期具有性的花粉高, 因而, 花药中的 LFLP 也是与小孢子年龄与活力有关的色素物质。单核期的不育花药中 LFLP 水平与可育花药相近, 二核期之后则以较高速率积累的现象, 符合通常已确认的花粉败育出现于单核晚期之后的结论。对 LFLP 的分析结果, 与我们过去报道雄性不育花药中高 MDA 含量, 高活性氧及有机自由基水平的结果^[4-6, 9]相一致, 从而提供新

的证据支持以前提出的雄性不育基因表达过程导致活性氧自由基代谢紊乱,膜脂过氧化作用加剧的观点。

还原型的 GSH 是天然抗氧化剂,是防御活性氧损伤的细胞保护系统的重要组分, BHT 为食品工业上常用的合成抗氧化剂。已有报道指出这两种抗氧化剂对水稻叶片延续衰老提高产量有一定的效应^[5]。本文中,经 GSH 和 BHT 处理的单核期花药 LFLP 含量有所降低,表明花药 LFLP 的形成积累受抗氧化剂水平的调节,提高细胞内抗氧化剂水平可延缓或抑制 LFLP 形成速率。膜脂过氧化作用是需氧反应,抗氧化剂的作用可能由于其进入胞内直接参与部份氧自由基的消除或影响细胞的氧化还原状态而减弱了膜脂过氧化作用。本文中只看到其对珍汕 97A 单核期花药的 LFLP 有轻微的影响。不同的发育材料的 LFLP 积累水平和速率,以及抗氧化剂处理效果虽有一些差别,如培矮 64s 的 LFLP 积累速率和水平比 W6154s 和珍汕 97 系低,对抗氧化剂处理的敏感性较小,但 CMS 水稻和 P(T)GMS 水稻的 LFLP 变化与育性及花粉发育阶段之间的关系甚为相似。由此可见,两类不同来源的雄性不育水稻的不育基因表达过程中,膜损伤和代谢变化有其共通性,其不育性皆与自由基启动的膜脂过氧化作用相关。

参考文献

- 1 Tappel A L. Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. In Trump B F, Arstila Au eds. Pathobiology of Cell Membrane, Academic Press, New York, 1975, vol 1, 145-170
- 2 Maguire Y P, Harrod N F. Fluorescent product accumulation in ripening fruit. Nature, 1975, 258:599-600
- 3 Wilhelm J, Wilhelms N. Accumulation of lipofuscin-like pigments in chloroplasts from senescent leaves of *Phaseolus vulgaris*. Photosynthetica, 1981, 15:55-60
- 4 林植芳等. 采后荔枝果实的类脂褐素和有机自由基水平的变化. 生物化学与生物物理研究进展, 1988, 15(5):377-378
- 5 林植芳等. 采后荔枝果实的氧化和过氧化. 植物学报, 1988, 30(4):382-387
- 6 王伟, 孙谷畴, 林植芳. 类脂褐素及丙二醛与 α -生育酚对它的影响. 植物生理学通讯, 1988, (3):32-34
- 7 孙谷畴, 林植芳. ABA 诱致叶绿体膜变化和脂褐素类似物积累. 植物生理学报, 1988, 14(4):395-397
- 8 陈贤丰, 梁承鄞. 水稻不育花药中 H_2O_2 的积累与膜脂过氧化加剧. 植物生理学报, 1991, 17(1):46-50
- 9 陈贤丰, 梁承鄞. HPGMR 不育花药能量代谢、 H_2O_2 积累与雄性不育关系. 植物生理学通讯, 1991, (1):21-24
- 10 陈贤丰, 梁承鄞. 湖北光周期敏感不育花药能量和活性氧代谢. 植物学报, 1992, 34(6):416-425
- 11 林植芳等. 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
- 12 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. Proc Crop Soc Japan, 1974, 43(1):31-35
- 13 Fletcher B L et al. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissue. Anal Chem, 1973, 52:1-9
- 14 Pauls K P et al. Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. Plant Physiol, 1984, 75:1152-1157
- 15 李双顺, 林桂珠, 林植芳. 抗氧化剂和激素对水稻叶片生理特性及籽实产量的影响. 中国科学院华南植物研究所集刊, 第7集, 1991, 75-82