

## 湖北光周期敏感核不育水稻农垦 58S 幼穗和 花药发育期的蛋白酶活性变化

孙谷畴 林植芳 林桂珠 梁承邨

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要** 湖北光周期敏感核不育水稻农垦 58S 的可育与不育株在一次枝梗期的幼穗中可溶性蛋白含量相近。雌雄蕊形成期和花粉母细胞分化期的可育株可溶性蛋白较不育株的分别高 21% 和 12.3%；可育株在花粉二核和三核期亦有较高含量。不育株在雌雄蕊形成期后，酪蛋白酶活性迅速增高，而可育株至二核期才增高。不育株除在二次枝梗期的内肽酶活性略低外，其余阶段酶的活性较高。育性转变时内肽酶类型亦发生变化。可育株有较高的氨肽酶活性。

**关键词** 光周期敏感核不育水稻；蛋白酶；可溶性蛋白；农垦 58S

## CHANGES IN ACTIVITIES OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN HUBEI PHOTOPERIOD SENSITIVE GENIC MALE- STERILE RICE AT THE STAGES OF PANICLE AND POLLEN DEVELOPMENT

Sun Guchou Lin Zhifang Lin Guizhu Liang Chengye

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

**Abstract** The content of soluble protein in panicle of Hubei photoperiod sensitive genic male-sterile rice, Nongken 58S, was nearly the same in both fertile and sterile plants at the stage of first panicle branch differentiation. Soluble protein contents in fertile plant at the stage of pistil and stamen formation and the stage of pollen mother cell differentiation were higher than those in the sterile one by 21% and 12.3%, respectively. Higher soluble protein content occurred at binucleate and trinucleate stages for the fertile plant. The activity of azocasein protease increased rapidly at the stage of pistil and stamen formation in male-sterile plant, whereas this process was not present in fertile plant until binucleate stage. Male-sterile plant had lower endopeptidase activity at the stage of second panicle branch differentiation, and higher activity of this enzyme appeared at other stages as compared

广东省科委基金资助课题

1996-06-19 收稿；1996-11-05 修回

缩写: PGMS— Photoperiod sensitive genic male-sterile rice 光周期敏感核不育水稻; PMSF— Phenylmethylsulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟; LNA— L-leucine- $\rho$ -nitroanilide 亮氨酸硝基酰替苯胺; PCMB—  $\rho$ -Chloromercuribenzoic acid 对氯汞苯甲酸; BAPA— N  $\alpha$ -benzoyl-L-arginine- $\rho$ -nitroanilide 苯甲酰-L-精氨酸-对-硝基酰替苯胺; EDTA— Ethylenediamine tetraacetic acid 乙二胺四乙酸

with the fertile plant. The endopeptidase patterns changed with the fertility. Higher aminopeptidase was observed in the fertile plant of rice.

**Key words** Photoperiod sensitive genic male-sterile rice; Proteolytic enzymes; Soluble protein; Nongken 58S

在植物组织和细胞中,蛋白质受蛋白质水解酶降解生成多肽和氨基酸,为细胞发育和分化提供物质和能量。蛋白酶类的生理功能包括蛋白质的水解和加工两个方面,它对体内蛋白质的周转,异常蛋白的降解,酶的活化,细胞骨架蛋白的修饰和多肽类激素的加工等都起着极为重要作用。但蛋白质被降解又能引起细胞器的破坏并使之失去正常的生理调节机能。研究花粉不同发育阶段的蛋白水解酶活性变化,有助于阐明植物育性转变的代谢特点。我们的工作曾表明,在花粉发育的不同阶段,不育花药具有4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),不育花药中游离组蛋白的相对百分率亦较可育花药低<sup>[1]</sup>。由于花药发育过程中可能涉及多个花药特异表达的基因,当雄性小孢子发育受阻,必然导致一系列代谢的变化,包括蛋白质的质和量的变化。代尧仁等曾比较过水稻二九南一号雄性不育系及相应保持系花药中某些呼吸酶和游离组蛋白的差异<sup>[2]</sup>。Chosh等曾证明,光周期变化诱致Rupsail水稻品种叶片一些酶的同功酶,如过氧化物酶、乳糖脱氢酶和乙醇脱氢酶同功酶变化<sup>[3]</sup>。我们的工作也表明水稻植株不育花药积累自由基<sup>[4]</sup>。自由基可能对蛋白修饰,或引起蛋白质的氧化损伤,而被修饰的蛋白则易受蛋白水解酶攻击和诱导酶活性增高<sup>[5]</sup>。利容千曾观察到水稻雄性不育系小孢子发育时细胞溶酶体的减少和消失,认为溶酶体被破坏后失去正常调节机能,可能放出各种水解酶,并引起细胞结构的变化<sup>[6]</sup>。研究湖北光周期敏感核不育水稻幼穗和花药分化中蛋白质及其水解酶活性变化,有助于进一步阐明农垦58S育性转变的生化生理基础。

## 1 材料和方法

以湖北光周期敏感核不育水稻农垦58S为材料。不育花药取自广州自然条件下6月下旬至9月上旬的田间不育植株。另一组处理是在幼苗5叶期至幼穗分化期同时遮光短日照处理而获得可育植株,并取得可育花药。根据丁颖方法<sup>[7]</sup>分别在幼穗发育和花粉分化期收集供试材料。所取材料置于预先冷却的乳钵中,在含有10 mmol/L 巯基乙醇的50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.4)中快速研磨,4℃。然后在20PR-52D型低温离心机12000×g离心15 min,收集上清液。一部分上清液用作测定蛋白水解酶和中性氨基酸酶活性。另一部分上清液经含10 mmol/L 巯基乙醇的50 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH5.4)透析过夜,4℃。再经12000×g低温离心20 min,取上清液测定内肽酶活性。

**酪蛋白水解酶活性测定** 参照Chrispeel等方法<sup>[8]</sup>,以溶于柠檬酸-磷酸缓冲液(pH5.7)的偶氮酪蛋白(Azocasein)为底物,加入含10 mmol/L 巯基乙醇的50 mmol/L Tris-HCl的酶液中,30℃,保温2 h。然后加入15% TCA终止酶反应。在冷却下静置15 min后,离心收集上清液。按Brinkley等方法<sup>[9]</sup>以酪氨酸为标准,测定酪氨酸含量以计算酶活性。

**内肽酶活性测定** 以底物BAPA(苯甲酰-L-精氨酸-对-硝基酰替苯胺)加入含10 mmol/L 巯基乙醇的50 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH5.4)的酶液中,酶反应时间20 min,30℃。然后加入25%

TCA 终止酶反应。经离心后测定上清液的 410 nm 光吸收, 以每小时光吸收变化 1.0 为单位计算酶活性<sup>[10]</sup>

**氨基酶活性测定** 以底物 LNA (亮氨酸硝基酰替苯胺) 加入含 10 mmol/L 巯基乙醇的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 的酶液中, 酶反应时间 30 min, 30 °C。然后以 25% TCA 终止反应, 经离心后测定上清液的 410 nm 光吸收, 并计算酶活性<sup>[9]</sup>。

PCMB、PMSF 溶液根据 Drivdahl 和 Thimann 方法配制<sup>[11]</sup>。在预先试验中证明加入 PCMB、PMSF 和 EDTA 不影响氨基酸测定。

## 2 实验结果

### 2.1 可育和不育株 PGMS 水稻幼穗和花药可溶性蛋白含量变化

图 1 看出, 除二次枝梗分化期外, 在幼穗分化的其它时期, 可育株幼穗的可溶性蛋白含量较不育株高。不育株幼穗中以二次枝梗分化期的蛋白量最高。可育株幼穗则以雌雄蕊形成期和花粉母细胞形成期的蛋白量最多; 且其数量比相应的不育株分别增高 21% 和 12.3%。在随后的花粉发育期中, 不育株的可溶性蛋白含量迅速下降, 三核期的含量仅为二次枝梗分化期的 45.8%, 并为同一发育期可育株含量的 54.7%。可育株的可溶性蛋白在花粉发育期虽有降低, 但下降比率较少, 其绝对值显著高于不育株。结果表明, 可育株在幼穗和花粉发育的大多数时期皆有较高的可溶性蛋白含量, 它为幼穗和花粉的正常分化发育提供了必要的物质和能量基础。在雌雄蕊形成期和花粉母细胞形成期可溶性蛋白含量高可能反映此时活跃的蛋白质合成。而不育株较低的蛋白质含量不利于幼穗分化和影响雄性小孢子的正常发育。

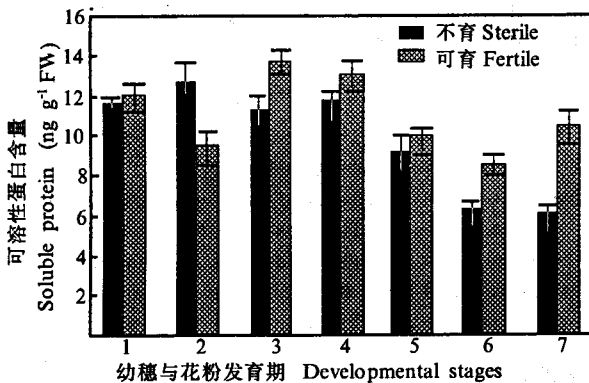


图 1 可育与不育的农垦 58S 在幼穗分化与花粉发育期中可溶性蛋白含量变化

Fig. 1 Changes in soluble protein content in fertile and sterile plants of male-sterile rice Nongken 58S at different stages of panicle and pollen development

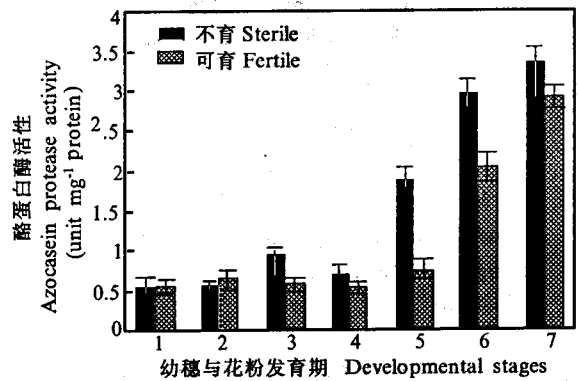


图 2 可育与不育的农垦 58S 在幼穗与花粉不同发育期中酪蛋白酶活性的变化

Fig. 2 Changes in activities of azocasein protease in fertile and sterile plants of male-sterile rice Nongken 58S at different stages of panicle and pollen development

1: 第一次枝梗分化期 First panicle branch differentiation stage; 2: 第二次枝梗分化期 Second panicle branch differentiation stage; 3: 雌雄蕊形成期 Pistil and stamen formation stage; 4: 花粉母细胞形成期 Pollen mother cell formation stage; 5: 花粉单核期 Pollen uninucleate stage; 6: 花粉二核期 Pollen binucleate stage; 7: 花粉三核期 Pollen trinucleate stage.

## 2.2 可育和不育株 PGMS 水稻幼穗和花药酪蛋白水解酶活性变化

从图 2 可见,在一次枝梗期,可育和不育株幼穗有近似的酪蛋白水解酶活性。自二次枝梗期以后至花粉母细胞形成期,不育株的酪蛋白酶活性逐步增高;而此时可育株的变化甚少。在花粉母细胞形成期后,不育株的酶活性迅速增高。单核期的酶活性比花粉母细胞形成期高 153%;三核期酶活性比单核期又高了 185%。可育株的酪蛋白酶活性在单核期甚少变化,直至二核期时才迅速增高。无论在二核期或是三核期,可育株皆比不育株低。这表明水稻植株在幼穗分化和花药发育过程中,蛋白水解作用增高。不育株始于雌雄蕊形成期,较可育株早,表明不育基因表达随着酪蛋白降解而增强。不育性组织中的酪蛋白酶活性变化与可溶性蛋白量变化呈相反趋势。酪蛋白的水解产物能转变为草酰乙酸和三羧酸循环中间产物,被消耗于呼吸作用之中。可育株的这一降解过程较为迟缓。

利用抑制剂的试验表明(图 3),金属蛋白酶抑制剂 EDTA 和丝氨酸型蛋白酶抑制剂 PMSF 对不育株单核期花药的酪蛋白酶抑制分别为 36.4% 和 39.7%,而半胱氨酸型抑制剂 PCMB 只抑制活性 22%,可见未经纯化的酪蛋白酶主要是含金属和丝氨酸型的,较少为半胱氨酸型。

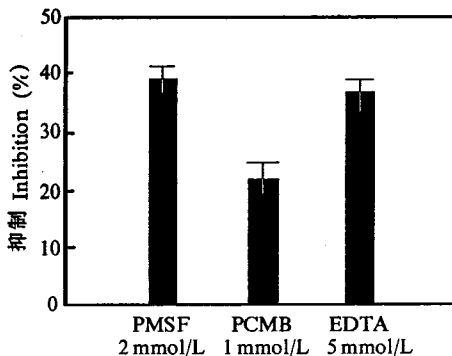


图 3 蛋白酶抑制剂对农垦 58S 不育株单核期花药中酪蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Effects of protease inhibitors on the activity of azocasein protease in sterile rice Nongken 58S at pollen uninucleate stage of anthers

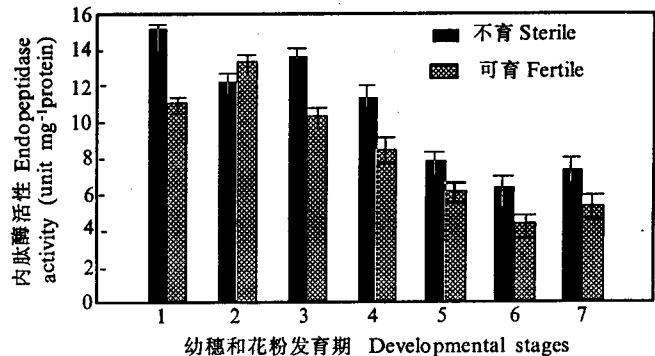


图 4 可育与不育的农垦 58S 水稻在幼穗和花粉发育不同阶段的内肽酶活性的变化

Fig. 4 Changes in activities of endopeptidase in fertile and sterile plants of male-sterile rice Nongken 58S at different stages of panicle and pollen development  
代表数字 1-7 与图 1 相同, Numbers 1-7 are the same as in Fig. 1

## 2.3 可育和不育株 PGMS 水稻幼穗和花药内肽酶活性变化

可育株一次枝梗期组织内 BAPA 内肽酶活性较不育株低 27%,至二次枝梗期其活性增高至略大于不育株,随后活性降低。在雌雄蕊形成期仅为二次枝梗期的 78.8%,二核期降至最低值。不育株则在一次枝梗期活性最高;雌雄蕊形成期后则降低。各个时期均以不育株为高。内肽酶是水解蛋白质肽键的内切酶,其活性较高与低可溶性蛋白量相关(图 4)。

利用 PMSF 和 PCMB 抑制内肽酶活性(图 5)表明,不育和可育株在雌雄蕊形成期和三核期均有丝氨酸型和半胱氨酸型内肽酶。两者在不同发育期反应不同。不育株在雌雄蕊形成期含较高半胱氨酸型;三核期则含较高丝氨酸型,此时可育株更多的为半胱氨酸型。看来水稻植株育性转变除了反映了内肽酶活性变化外,其类型亦有变化。

### 2.4 可育和不育株 PGMS 水稻幼穗和花药氨基酶活性变化

图 6 结果表明, 可育株在一次枝梗期的亮氨酸氨基酶活性较不育株高 58%。除可育株在二核和三核期的氨基酶活性略有降低外, 在前期和中期酶活性一直保持在较高水平。不育株则从二次枝梗期开始增高, 至单核期达最高值, 二核和三核期仍有较高的酶活。与酪蛋白酶和 BAPA 内肽酶不同, 整个幼穗和花粉分化期中, 可育株的氨基酶活性比不育株高。表 1 的抑制试验表明, 在雌雄蕊形成期和三核期, PCMB 对可育株氨基酶的抑制较不育株大, 即可育株的半胱氨酸型占优势。在雌雄蕊形成期, 可育株亦含有一部分含金属型的氨基酶; 不育株在雌雄蕊形成期和三核期只含少量含金属型的酶, 未检测到丝氨酸型酶存在。结果表明农垦 58S 幼穗和花药的氨基酶主要为活性中心含巯基的半胱氨酸型(表 1)。

表 1 蛋白酶抑制剂对农垦 58S 水稻氨基酶活性的影响 (抑制 %)

Table 1 Effects of protein inhibitors on the activity of aminopeptidase in Nongken 58S rice (% of inhibition)

抑制剂 Inhibitor	不育性 Sterile		可育性 Fertile	
	雌雄蕊形成期 PSS	三核期 TNS	雌雄蕊形成期 PSS	三核期 TNS
	PMSF 2 mmol/L	0	0	0
PCMB 1 mmol/L	25.4 ± 2.3	26.1 ± 0.8	54.6 ± 3.0	33.9 ± 1.3
EDTA 5 mmol/L	8.5 ± 1.2	12.1 ± 2.6	22.2 ± 1.7	9.6 ± 0.5

PSS: 雌雄蕊形成期 Pistil and stamen formation stage;

TNS: 三核期 Trinucleate stage

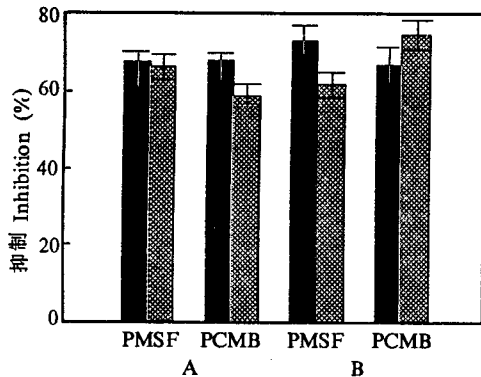


图 5 蛋白酶抑制剂对农垦 58S 水稻内肽酶活性的影响

Fig. 5 Effects of protein inhibitors on endopeptidase activity in Nongken 58S rice

A: 雌雄蕊形成期 Pistil and stamen formation stage; B: 花粉三核期 Trinucleate stage of pollen; ■ 不育 Sterile; ▨ 可育 Fertile

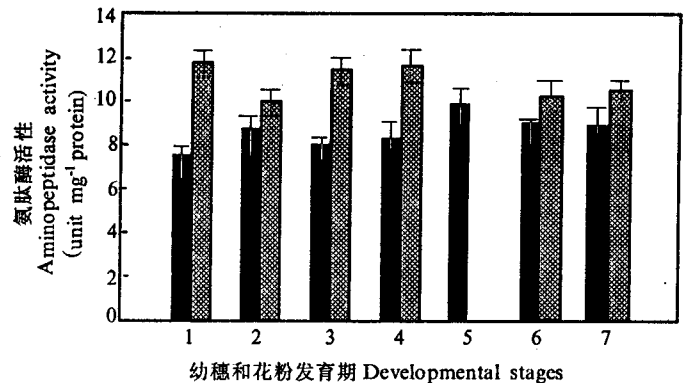


图 6 可育与不育的农垦 58S 水稻幼穗和花粉发育期中氨基酶活性变化

Fig. 6 Changes in activities of aminopeptidase in fertile and sterile plants of Nongken 58S rice at different stages of panicle and pollen development

代表数字 1-7 与图 1 相同, Numbers 1-7 are the same as in Fig. 1; ■ 不育 Sterile; ▨ 可育 Fertile

## 3 讨论

细胞内蛋白酶系统催化蛋白质的有限降解受到组织和细胞的状态所调节。蛋白质经过修饰, 易为蛋白水解酶降解。在组织衰老和不利的内外因子影响下, 蛋白质被修饰而诱导蛋白酶活性增高。Leonardo 等证明活性氧诱导燕麦叶绿体叶绿素蛋白复合体变化和内肽酶活性增高<sup>[12]</sup>。水稻叶片衰老时出现自由基积累<sup>[14]</sup>。自由基可能造成蛋白质氧化损伤, 氧化的蛋白对蛋白水解酶反应

敏感, 易为蛋白酶水解<sup>[5]</sup>。另一方面, 蛋白酶类主要存在于液泡、溶酶体和一些细胞器中。Wittenbach 证明衰老小麦叶片的液泡蛋白酶参与叶绿体降解<sup>[13]</sup>。利容千曾观察到水稻雄性不育系小孢子发育后阶段溶酶体明显减少, 线粒体的嵴及各种膜状结构内质网等模糊不清, 数量减少<sup>[6]</sup>。高忠等观察到小麦叶片衰老过程中液泡膜与叶绿体膜边缘模糊的现象<sup>[15]</sup>。据此可推测雄性不育株花粉发育期有较高的酪蛋白酶和 BAPA 内肽酶活性, 可能也由于活性氧对膜系统的过氧化损伤, 引起膜透性改变而释出蛋白酶之故。高的蛋白酶活性引起低蛋白含量, 从而造成小孢子发育障碍。

亮氨酸氨肽酶是一种中性氨肽酶, 为一种外肽酶, 它作用于天然蛋白和长链多肽, 其底物需要  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 和  $\alpha$ -COO 基。此酶可优先水解谷氨酸或天门冬氨酸羧基末端侧链的肽键<sup>[16]</sup>。增加组织内谷氨酸和天门冬氨酸, 有助于新蛋白质和有机酸的合成。本文的结果表明可育株在整个幼穗分化和花药发育期的亮氨酸氨肽酶活性均比不育株高, 且不论可育株或不育株, 其活性变幅皆不大。我们推测亮氨酸氨肽酶主要功能为蛋白质的加工。

综观试验的三种蛋白酶活性变化, 发现内肽酶和氨肽酶活性在一次枝梗期在不育与可育株已有差别, 但可溶性蛋白量差异不大, 反映此时不育株蛋白质代谢仍具有一定的平衡调节。酪蛋白酶活性与可溶性蛋白量在不同育性株间的差异始于雌雄蕊形成期前后, 这意味着自此之后不育株蛋白质代谢明显趋于降解, 从而影响小孢子的正常发育。

Cheng 等曾指出了水稻叶片衰老时酶活性类型变化及其与蛋白降解的关系<sup>[17]</sup>。利用专一抑制剂分析和鉴定的结果表明, 在水稻不同幼穗分化和花药发育期中, 蛋白酶系统对不同抑制剂敏感性不同。酶类型变化则对不同蛋白和多肽的水解具有选择性。光周期变化可能引起不同蛋白酶系统的表达在时间和顺序上的变化, 从而导致蛋白质代谢的变化。有关水稻育性转变与蛋白酶系统表达的关系, 仍有待进一步研究。

## 参考文献

- 1 张建华, 林植芳, 孙谷畴等. 光周期诱导光敏感核不育水稻花药蛋白变化的研究. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(3): 62-69
- 2 代尧仁, 孙振荣等. 水稻二九南一号雄性不育系及相应保持系在花药中某些呼吸酶和游离组蛋白的比较研究. 遗传学报, 1987, 5(3):227-233
- 3 Chosh J K, Sengupta D N, Sen S P. Changes in protein patterns in the leaves of rice in relation to the initiation of reproductive phase I. The photoperiod sensitive cultivar Rupsial. *Plant Biochem J*, 1980, 7(2):138-150
- 4 林植芳, 梁承邨, 孙谷畴等. 雄性不育小孢子败育与花粉的有机自由基水平. 植物学报, 1993, 35(3):215-221
- 5 Agarwal S, Sohal R S. Aging and proteolysis of oxidized proteins. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 309(1):24-28
- 6 利容千. 水稻雄性不育系和保持系花粉发育的透射及扫描显微镜研究. 武汉大学学报(自然科学版), 1979, 1:61-64
- 7 丁颖. 中国水稻栽培学. 北京:北京农业出版社, 1961, 81-85
- 8 Chrispeel M J, Boulter D. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung bean: Role of endopeptidase. *Plant Physiol*, 1975, 55:1031-1037
- 9 Binkley F, Leibach F, King N. A new method of peptidase assay and the separation of three leucylglycinases of renal tissue. *Arch Biochem Biophys*, 1968, 128:397-405
- 10 Batt R, Wallace W. Characteristics of the active site and substrate specificity of a maize root endopeptidase. *Biochem Biophys Acta*, 1989, 990:109-112

- 11 Drivdahl R H, Thimann K V. Proteases of senescing oat leaves II. Reaction to substrates and inhibitors. *Plant Physiol*, 1978, 61:501-505
- 12 Leonardo M C, Leonardo D G, Trippi V S. Oxygen- and light-induced proteolysis in isolated oat chloroplast. *Plant Cell Physiol*, 1990, 31(3):377-382
- 13 Wittenbach V A. Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol*, 1982, 69:98-102
- 14 林植芳, 林桂珠, 李双顺等. 衰老叶片和叶绿体中超氧阴离子和有机自由基浓度的变化. *植物生理学报*, 1988, 14(3): 234-238
- 15 高忠, 张荣铎, 方敏. 植物叶片中 RuBP 羧化酶/加氧酶及光反应机构衰老机理的研究进展. *南京农业大学学报*, 1995, 18(2):26-33
- 16 Rivett A J. Intracellular protein degradation. In: Tipton K F ed. *Essays in Biochemistry*, Vol 25, Academic Press. London, San Diego, New York, Berkeley, Sydney, Tokyo, Toronto, 1990, 39-74
- 17 Cheng S H, Kao C H. The role of proteolytic enzymes in protein degradation during senescence of rice leaves. *Physiol Plant*, 1984, 62:231-237