

细胞质雄性不育水稻幼穗和花粉发育期的蛋白酶活性变化

孙谷畴 林植芳 林桂珠 梁承邺

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 水稻细胞质雄性不育系珍汕 97A, 在花粉母细胞形成期以后可溶性蛋白含量迅速降低。单核期仅为花粉母细胞形成期的 56%, 二核期和三核期分别为花粉母细胞形成期的 36.4% 和 30.3%。保持系珍汕 97B 虽在花粉母细胞形成期后可溶性蛋白含量降低, 但在二核期则有所增高, 表现为鞍形变化过程。在花粉母细胞形成期后, 珍汕 97A 的酪蛋白水解酶活性增高, 单核期为前一时期的 1 倍, 而珍汕 97B 的酶活性增幅较小。第一次枝梗分化期珍汕 97A 的内肽酶活性较珍汕 97B 高, 而雌雄蕊形成期两者的酶活皆降低。整个发育期中珍汕 97A 的内肽酶活性较珍汕 97B 高 15% 至 55.5%。珍汕 97A 在幼穗第一次枝梗分化期时氨肽酶活性较珍汕 97B 高。第二次枝梗分化期后, 不育系和保持系的氨肽酶活性均下降。但花粉母细胞形成期后, 珍汕 97A 的氨肽酶活性迅速增高, 三核期达最高水平, 这可能意味着此时大量蛋白质被水解。蛋白酶类抑制剂的实验表明, 在雌雄蕊形成期后不育系和保持系含有半胱氨酸型氨肽酶和约 10% 含金属型氨肽酶; 而在三核期, 保持系的氨肽酶则主要为半胱氨酸型。不育系三核期含有的 BAPA 内肽酶包括半胱氨酸型、丝氨酸型, 以及部分含金属酶类; 而保持系三核期的内肽酶仅为丝氨酸型。不育系肽酶类型的变化, 可能反映酶基因编码的去抑制。

关键词 细胞质雄性不育水稻; 育性; 蛋白酶

CHANGES IN ACTIVITIES OF PROTEASES AT PANICLE AND POLLEN DEVELOPMENTAL STAGES OF CYTOPLASMIC MALE STERILE RICE

Sun Guchou Lin Zhifang Lin Guizhu Liang Chengye

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

Abstract The soluble protein content in spikelet of Zhenshan 97A of cytoplasmic male sterile rice decreased rapidly after the formation stage of pollen mother cell (PMC). It was 56%, 34.6% and 30.3% at uninucleate, binucleate and trinucleate stages of pollen, respectively, as compared with that at the formation stage of PMC. The content of soluble protein in maintainer line Zhenshan 97B also decreased, but again increased at pollen binucleate stage, which showed a pattern with saddle curve. The activity of azocasein

广东省科委资助项目

1996-08-29 收稿; 1996-12-24 修回

缩写 Abbreviations: PMSF—苯甲基磺酰氟 Phenylmethylsulfonyl fluoride; LNA—亮氨酸硝基酰替苯胺 L-leucine- ρ -nitroanilide; PCMB—对氯汞苯甲酸 ρ -chloromercuribenzoic acid; BAPA—苯甲酰-L-精氨酸-对-硝基酰替苯胺 N α -benzoyl-L-arginine- ρ -nitroanilide; EDTA—乙二胺四乙酸 Ethylenediamine tetraacetic acid

protease increased in Zhenshan 97A after the PMC formation stage, whereas less change in activity of this enzyme was found in the maintainer line. The activity of endopeptidase in Zhenshan 97A at the stage of first panicle branch differentiation was higher than that in Zhenshan 97B, and it decreased at the stage of pistil and stamen formation in both the sterile and the maintainer lines. The activity of endopeptidase in sterile line was higher than that in maintainer line by 15% to 55.5% at all developmental stages. At the stage of first panicle branch differentiation, the activity of aminopeptidase for the sterile line was higher than that for the maintainer one. After the stage of PMC formation, the activity of aminopeptidase increased rapidly and reached to the maximum level at pollen trinucleate stage for the sterile line. It may imply that more protein in sterile plants was proteolysed at this stage. The results of protease inhibitor test indicated that aminopeptidase in sterile and maintainer lines after the formation stage of pistil and stamen was of cysteine type with 10% of metalloprotease. However, aminopeptidase in maintainer line at trinucleate pollen stage belonged mainly to the cysteine type. Endopeptidase, BAPA, from sterile line at trinucleate stage showed cysteine- and serine types, and also part of type with metalloprotease, but it was the serine type only in maintainer line. The changes in peptidase types may reflect the derepression of the gene coding of peptidase in cytoplasmic male sterile rice.

Key words Cytoplasmic male sterile rice; Fertility; Protease

植物细胞质雄性不育的研究早为国内外学者所重视,但迄今对水稻细胞质雄性不育的机理仍缺乏深入的研究。戴尧仁等曾以二九南1号水稻不育系及其保持系为材料,研究了不同花粉发育期过氧化物酶同功酶和游离组蛋白变化^[1]。有些研究者研究过几种水稻雄性不育类型花粉形成和发育的细胞形态,认为代谢的障碍可能是造成雄性不育原因之一^[2]。早在1972年 Laser 等认为花粉败育的形成和时期是多种多样的^[3]。水稻不育类型花粉的败育可能出现在单核花粉晚期^[4],一般败育的表现细胞内容物空缺,这可能与源物质供应不足和细胞本身物质的分解和合成代谢不平衡有关。我们过去的工作表明,雄性不育水稻小孢子败育伴随着花粉有机自由基水平的增高^[5]。自由基对于细胞质雄性不育水稻的生化特性的影响仍所知甚少。本文报道了细胞质雄性不育水稻珍汕97A和保持系珍汕97B幼穗和花粉不同发育阶段的蛋白酶活性变化,为雄性不育水稻的不育性机理和保持系培育提供一些理论依据。

1 材料和方法

不育系珍汕97A和保持系珍汕97B材料栽种于华南植物研究所试验田。一般田间管理。根据丁颖方法确定分化期^[6],分别在幼穗发育和花粉分化的不同时期收集幼穗和花药作为供试材料。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)中于4℃下快速研磨。然后在20PR-52D型低温高速离心机12000×g离心15 min,

收集上清液。部分上清液用作测定酪蛋白水解酶和中性氨肽酶活性。另一部分经 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 12 000 × g 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 以溶于柠檬酸-磷酸缓冲液 (pH5.7) 的偶氮酪蛋白为底物, 加入含 10 mmol/L 巯基乙醇的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液的酶液中, 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, 以酪氨酸为标准, 测定生成的酪氨酸含量以计算酶活性。

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

氨肽酶活性测定 含 10 mmol/L 巯基乙醇的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 中的酶液, 加入底物 LNA(L-亮氨酸-对-硝基酰替苯胺), 酶反应 30 min, 30 ℃。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^[7,8]。

根据 Drivdahl 和 Thimann 方法^[9] 配制 PCMB 和 PMSF 溶液。在预先试验中证明加入 PMSF, PCMB 和 EDTA 对氨基酸测定无影响。以上试验经四次重复测定, 取其平均值计算。

2 结果

2.1 可溶性蛋白含量的变化

细胞质雄性不育系珍汕 97A 和保持系珍汕 97B 在幼穗一次枝梗分化期至雌雄蕊形成期, 两者具有相近的可溶性蛋白含量。自雌雄蕊形成期后, 保持系珍汕 97B 的可溶性蛋白含量降低, 至单核期达至最低值, 随后则有所增高, 三核期时接近一次枝梗期的含量水平, 表现鞍型变化过程。这可能由于雌雄蕊形成期后组织分化需要大量能量和物质供应, 氮素用于结构蛋白的比例较大, 导致可溶性蛋白含量降低。而珍汕 97A 不育系, 在花粉母细胞分化期后可溶性蛋白含量迅速降低, 单核期的可溶性蛋白含量仅为花粉母细胞形成期的 56%, 二核期和三核期分别为花粉母细胞形成期的 36.4% 和 30.3%。不育系珍汕 97A 的可溶性蛋白含量的持续降低可能是细胞质雄性不育性的一种征象 (图 1)。幼穗分化期用于分析可溶性蛋白量的材料是整个幼穗组织, 花粉发育期的材料则用花药。这可能也是引起花粉发育期与幼穗分化期可溶性蛋白水平不同的一种原因。

2.2 酪蛋白水解酶活性变化

图 2 表明, 细胞质雄性不育系珍汕 97A 和保持系珍汕 97B 在花粉母细胞形成期前的阶段, 其酪蛋白水解酶活性相近, 表明两者并无明显差异, 而在花粉母细胞形成期后, 珍汕 97A 的酪蛋白水解酶活性迅速增高, 在单核期较前者增加 1 倍, 在三核期约为花粉母细胞形成期的 2 倍。高的酪蛋白水解酶活性可能导致大量酪蛋白被降解。而保持系珍汕 97B 虽在雌雄蕊形成期后酪蛋白水解酶活性有所增高, 但增幅较小, 且单核期和三核期的活性差别不大。这表明在花粉母细胞形成期后水稻组织有着酪蛋白水解酶活性增高的过程, 而珍汕 97A 比珍汕 97B 的增高显著较大。

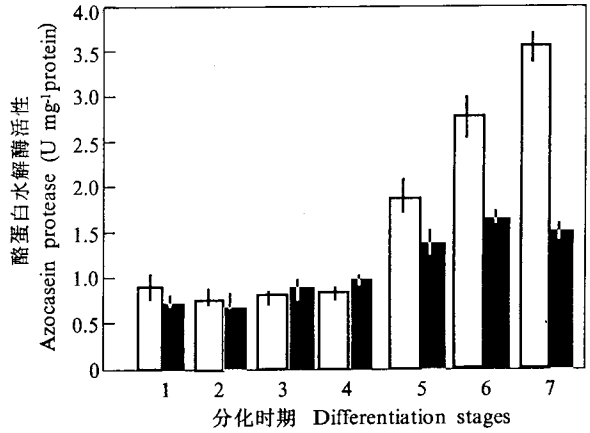
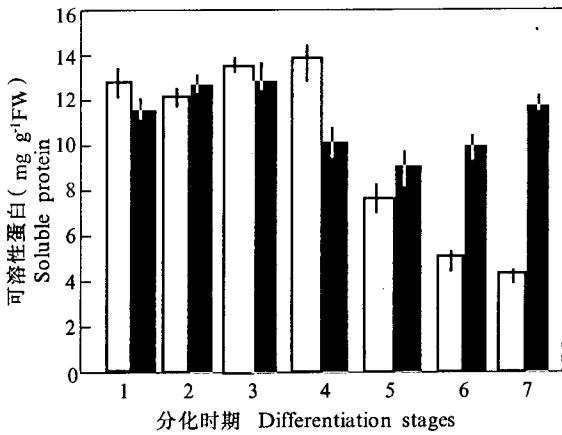


图1 珍汕 97A 和珍汕 97B 幼穗和花粉不同发育期的可溶性蛋白质含量的变化

图2 珍汕 97A 和珍汕 97B 幼穗和花粉不同发育期酪蛋白酶活性的变化

Fig. 1 Changes in content of soluble protein in sterile line Zhenshan 97A and maintainer line Zhenshan 97B at different panicle differentiation stages

Fig. 2 Changes in activity of azocasein protease in Zhenshan 97A and Zhenshan 97B at different panicle differentiation stages

□ 不育系珍汕 97A Sterile line Zhenshan 97A ■ 保持系珍汕 97B Maintainer line Zhenshan 97B

1. 一次枝梗分化期 1st panicle branch differentiation stage; 2. 二次枝梗分化期 2nd 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; 5-7. 花粉发育期 Pollen developmental stage; 5. 单核期 Uninucleate; 6. 二核期 Binucleate; 7. 三核期 Trinucleate

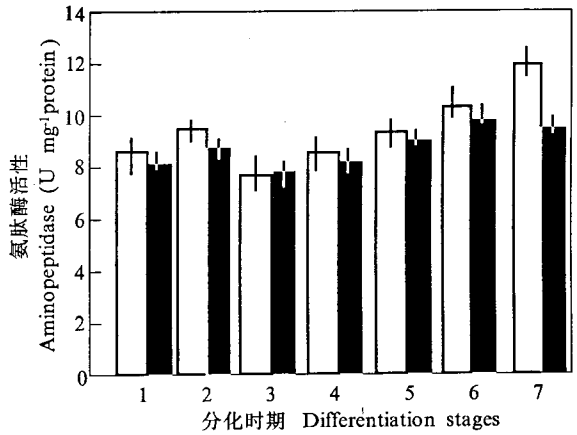
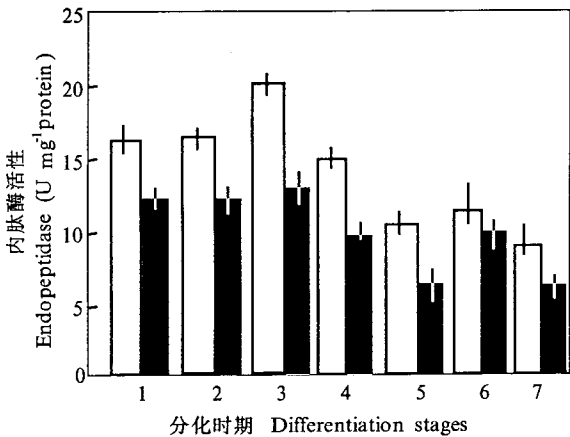


图3 珍汕 97A 和珍汕 97B 在幼穗和花粉发育不同阶段内肽酶活性变化

图4 珍汕 97A 和珍汕 97B 在幼穗和花粉不同发育阶段氨基酶活性变化

Fig. 3 Changes in endopeptidase activity in Zhenshan 97A and Zhenshan 97B at different panicle differentiation stages

Fig. 4 Changes in aminopeptidase activity in Zhenshan 97A and Zhenshan 97B at different panicle differentiation stages

□ 不育系珍汕 97A Sterile line Zhenshan 97A ■ 保持系珍汕 97B Maintainer line Zhenshan 97B

图中数字如图1所示 Numbers 1-7 are the same as in Fig. 1

2.3 内肽酶活性变化

从图3可见,在一次枝梗分化期珍汕97A的内肽酶活性较珍汕97B高。在雌雄蕊形成期后,两者均出现酶活性降低,这可能表明此发育期是以蛋白质合成代谢为主。在单核期进入二核期,内肽酶活性有所增高。整个发育期中,珍汕97A比珍汕97B有较高的内肽酶活性,增高幅度在15%至55.5%之间。

2.4 氨肽酶活性变化

图4中可见,珍汕97A不育系在幼穗一次枝梗期和二次枝梗期的氨肽酶活性较保持系珍汕97B高。不育系和保持系的二次枝梗期酶活性高于一次枝梗期。自二次枝梗期后,不育系和保持系的酶活皆降低,两者有相近的酶活水平。花粉母细胞形成期后,不育系珍汕97A的氨肽酶活性增高较快,至三核期酶活达最高水平,约增高14.7%。相对而言,保持系珍汕97B的酶活增高较缓慢,酶活水平亦比不育系珍汕97A低。不育系和保持系的氨肽酶活性变化进程与酪蛋白水解酶相近似。在花粉母细胞形成期后不育系的酶活急剧上升,可能导致大量蛋白质被降解;而保持系的酶活变化通常较为缓慢,酶活亦较低。

2.5 不同阶段的肽酶类型变化

不同类型的蛋白酶的活性中心有其特有的氨基酸残基排列,形成专一的构型^[7]。根据酶活性中心氨基酸残基种类与是否含有结合的金属原子,将蛋白酶类区分为受PMSF抑制的丝氨酸蛋白酶,受PCMB抑制的半胱氨酸酶和受EDTA抑制的金属蛋白酶,以及受pepstatin A抑制的天门冬氨酸蛋白酶。我们对珍汕97A和珍汕97B蛋白酶类型的鉴定(表1)可见,在雌雄蕊形成期不育系和保持系的半

表1 不同抑制剂对珍汕97A及保持系在雌雄蕊形成期和三核期的氨肽酶和内肽酶活性的抑制作用

Table 1 Effects of different protease inhibitors on the activities of aminopeptidase and endopeptidase in Zhenshan 97A and its maintainer line at pistil and stamen formation stage and pollen trinucleate stage

酶 Enzyme	品系 Line	发育期 Developmental stages	抑制 Inhibition (%)		
			PMSF	PCMB	EDTA
氨肽酶 Amino-peptidase	珍汕 97A Zhenshan 97A	雌雄蕊形成期 Pistil	0	29.5 ± 0.3	7.6 ± 1.0
		三核期 Trinucleate	3.6 ± 0.6	57.3 ± 1.1	44.8 ± 0.7
	珍汕 97B Zhenshan 97B	雌雄蕊形成期 Pistil	0	26.2 ± 0.4	8.8 ± 0.3
		三核期 Trinucleate	0	22.2 ± 0.3	4.9 ± 0.2
内肽酶 Endo-peptidase	珍汕 97A Zhenshan 97A	雌雄蕊形成期 Pistil	ND	ND	ND
		三核期 Trinucleate	48.5 ± 0.8	51.6 ± 0.2	16.9 ± 0.1
	珍汕 97B Zhenshan 97B	雌雄蕊形成期 Pistil	51.7 ± 1.0	28.9 ± 0.6	2.3 ± 0.5
		三核期 Trinucleate	39.8 ± 0.8	0	0

ND: 未检测 Not determined

胱氨酸氨肽酶的比例相近(26—30%)并含有低于10%的含金属酶。而在三核期,PCMB和EDTA分别抑制不育系氨肽酶活性的57.3%和44.8%,即不育系的氨肽酶为半胱氨酸型和含金属的酶型。而保持系在三核期则含半胱氨酸酶,受EDTA抑制仅约5%。酶类型的变化反映了氨肽酶基因编码的抑制和去抑制。珍汕97A三核期较珍汕97B含有较多的半胱氨酸和含金属型的氨肽酶,这可能与不育系出现含半胱氨酸和含金属型氨肽酶基因编码的去抑制有关。保持系珍汕97B

在雌雄蕊形成期 PMSF 和 PCMB 对内肽酶抑制分别为 51.7% 和 28.9%，此时期的内肽酶包括丝氨酸型和半胱氨酸型。珍汕 97A 的三核期亦以丝氨酸型和半胱氨酸型内肽酶为主，以及少部分含金属型酶；而珍汕 97B 则以丝氨酸型内肽酶为主，这意味着细胞质雄性不育系表现为三核期含半胱氨酸型内肽酶基因编码的明显去抑制。

3 讨论

植物组织存在多种蛋白酶，它们使蛋白质水解成低分子的多肽和氨基酸，以利用于植物呼吸代谢和物质合成，为细胞分化和发育提供能量和物质。因此，物质代谢的状况及动态与细胞分化和育性转变有密切的关系，但人们对此的认识仍相当有限。本文对水稻幼穗和小孢子发育过程中可溶性蛋白含量的研究发现，在雌雄蕊形成期以后，细胞内可溶性蛋白含量降低，可能是由于水稻生殖器官的发育和细胞体积的增大，大量营养物质被利用之故。当从单核期进入二核期，则可能由于染色体复制大量 DNA、RNA 和蛋白质，而来自植株其它部分的物质供应增多，于是细胞内再次出现可溶性蛋白的增高。在正常发育的保持系珍汕 97B 植株中，幼穗与花药组织内可溶性蛋白含量变化表现为鞍形变化过程。而不育系珍汕 97A 则由于小孢子败育造成的代谢障碍和对物质吸收强度低，而引起在花粉母细胞形成期后细胞可溶性蛋白含量大幅度降低，至三核期达到最低值。可溶性蛋白含量降低将表现为细胞内容物空缺。有些研究者已观察到此现象^[2]。无论不育系珍汕 97A 或保持系珍汕 97B，在花粉母细胞形成期都有较低的酪蛋白水解酶活性，而在此期以后，珍汕 97A 的酪蛋白水解酶活性迅速增高，表现酪蛋白被动员和水解成呼吸的中间产物，如草酰乙酸进入三羧酸循环而被消耗，而珍汕 97B 此过程则相对较为缓和，酶活性的增高在进入二核期则告结束。除了在一次和二次枝梗期内氨肽酶活性有变化外，在整个生育期，氨肽酶活性变化和酪蛋白水解酶的极相似，表现为花粉母细胞形成期进入单核期时，酶活性急剧增高；而保持系明显低于不育系。在整个幼穗和花药发育期，不育系的内肽酶活性比保持系高。蛋白酶或肽酶活性较高是细胞质雄性不育系大量物质被动员和消耗，造成代谢上障碍所致。这可能是导致细胞质雄性不育的一种生理机理。

水稻叶片衰老时，氨肽酶活性增高^[9,10]。戴尧仁等亦曾证明在二核和三核期，珍汕 97A 不育系的过氧化物酶活性较保持系低^[1]。我们亦曾证明，水稻花粉的败育导致有机自由基水平提高^[9]。低的过氧化物酶活性和高的有害氧自由基积累，容易造成蛋白质的氧化修饰，而被氧化的蛋白对蛋白酶的反应比正常蛋白更为敏感。据此推测，不育系蛋白质加速降解的原因，一方面是自由基对蛋白质的氧化修饰可能影响一些蛋白酶抑制剂，从而减弱或解除其对蛋白酶类的抑制，提高蛋白酶活性。另一方面，活性氧自由基也会诱导膜的改变，促进蛋白酶从细胞器释出和被活化。细胞质雄性不育系在单核期之前酪蛋白水解酶和 BAPA 内肽酶活性的增高，都会出现不育性和蛋白质代谢异常变化。从此变化动态看来，可育性与不育性之间的代谢差异开始出现于花粉母细胞形成期。

Chosh 等认为酶的类型受激素的影响^[11]。珍汕 97A 不育系的肽酶类型随不同发育阶段的变化，反映了在不同时期酶的类型可能受发育阶段中不同激素类型与水平的调节。本文虽未研究细胞质雄性不育性与激素调节的关系。但酶类型的变化反映了肽酶基因编码出现去抑制过程，此亦

可能与激素调节有关。有关激素与不育性转变的关系尚有待进一步研究。

参考文献

- 1 戴尧仁, 孙振荣等. 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比较研究. 遗传学报, 1978, 5:227-231
- 2 中山大学生物系. 作物三系生物学特征的研究 III. 几种水稻雄性不育类型的花粉形成与发育的细胞形态, 代谢障碍和花隔维管束发育的比较研究. 遗传学报, 1976, 2:119-127
- 3 Laser K D, Lersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot Rev, 1972, 38(3):425-435
- 4 梁承邨, 陈贤丰, 孙谷畴等. 湖北光周期敏感核不育水稻农垦 58S 花药中的某些生化代谢特点. 作物学报, 1995, 21(1):64-69
- 5 林植芳, 梁承邨, 孙谷畴等. 雄性不育水稻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
- 6 丁颖. 中国水稻栽培学. 北京: 农业出版社, 1961, 75-86
- 7 Newrath H. Evolution of proteolytic enzymes. Science, 1984, 221:350-352
- 8 Radlowshi M, Kolinowshi A, Krotikoroshi Z et al. Protease activity from maize pollen. Phytochem, 1994, 35(4):853-856
- 9 Drivdahl R H, Thimann K V. Proteases of senescing oat leaves. II. Reaction to substrates and inhibitors. Plant Physiol, 1978, 61:501-505
- 10 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
- 11 Chosh J K, Senqupta D N, Sen S P. Changes in protein patterns in the leaves of rice in relation to the inhibition of reproductive phase. I. The photoperiod sensitive cultivar Rupsial. Plant Biochem J, 1980, 7(2):138-150