

细胞质雄性不育水稻的呼吸作用和自由基代谢的关系初探

张明永 段俊 梁承邺

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 用呼吸电子传递细胞色素途径的抑制剂氰化钾(KCN)与抗氰呼吸途径的抑制剂水杨基氧肟酸(SHAM)处理水稻细胞质雄性不育系(CMS)珍汕97A及其保持系珍汕97B的幼穗和花药后, KCN使不育系与保持系的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)产生受到抑制, 不育系的 $O_2^{\cdot-}$ 的形成受抑制较多。SHAM处理则增高 $O_2^{\cdot-}$ 形成, 以不育系的增加较多。KCN与SHAM处理后都使不育系与保持系的丙二醛(MDA)含量升高, KCN使保持系的MDA含量升高较多, SHAM则使不育系的MDA含量升高较多。KCN处理后, 不育系与保持系的超氧化物歧化酶(SOD)活性下降, SHAM处理后不育系与保持系的SOD活性变化不明显。 H_2O_2 处理对不育系与保持系幼穗的呼吸速率影响不大。 $H_2O_2+FeSO_4$ 处理后, 使呼吸速率大幅度下降, 表明 $H_2O_2+FeSO_4$ 所形成的羟自由基($\cdot OH$)比 H_2O_2 对呼吸代谢的破坏作用更大。

关键词 呼吸作用; 自由基; 雄性不育; 水稻

中图分类号 S511.01

THE RELATIONSHIP BETWEEN RESPIRATION AND ACTIVATED OXYGEN METABOLISM IN CYTOPLASMIC MALE STERILE RICE

Zheng Mingyong Duan Jun Liang Chengye

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

Abstract The superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) formation rates in the young panicles and anthers of cytoplasmic male sterile (CMS) rice Zhenshan 97A (97A) and its maintainer Zhenshan 97B (97B) were inhibited by KCN, and accelerated by salicylhydroxamic acid (SHAM), but the percentage of $O_2^{\cdot-}$ formation inhibited by KCN or accelerated by SHAM in sterile rice 97A was more than that in fertile rice 97B. The malondialdehyde (MDA) content in both of 97A and 97B increased after KCN or SHAM treatment, but the great change of MDA was found in 97B treated by KCN or in 97A treated by SHAM. Superoxide dismutase (SOD) activity was inhibited by KCN, but was not affected by SHAM. The respiratory rates of 97A and 97B decreased after $H_2O_2+FeSO_4$ treatment while it did not change by H_2O_2 treatment alone.

Key words Respiration; Reactive radicals; Cytoplasmic male sterility; Rice

在电子沿正常的呼吸电子链传递过程中, 电子最后传递给氧, 形成水和跨线粒体膜的电化学梯度, 经氧化磷酸化而形成 ATP。但电子在电子传递链的不同部位都可对氧进行单电子还原, 而形成 $O_2^{\cdot-}$ ^[1,2], 表明线粒体既是呼吸代谢的重要场所, 也是活性氧形成的场所之一。同时线粒体中也存在 SOD, 能将其自身产生的 $O_2^{\cdot-}$ 清除^[1]。已发现雄性不育花药的呼吸速率、抗氰呼吸占总呼吸的比例、以及三羧酸循环、磷酸戊糖途径中的部分酶活性较可育花药低^[3-5], 这些研究表明雄性不育花药中的呼吸代谢出现了异常。而且也发现水稻雄性不育花药中的 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率、有机自由基水平、 H_2O_2 及膜脂过氧化产物 MDA 较高, 但其活性氧清除酶 (SOD、CAT) 活性则较保持系的可育花药的^[6-8], 表明雄性不育花药的活性氧代谢也出现了异常。但这两条途径间在不育系与保持系中的相互关系则未见报道, 本文利用两种代谢相关的药剂处理 CMS 水稻不育系与保持系幼穗, 探讨不育系与保持系对外源药剂处理的反应。

1 材料和方法

材料 细胞质雄性不育水稻珍汕 97A (Zhenshan 97A) 和保持系珍汕 97B (Zhenshan 97B)。

KCN 与 SHAM 对幼穗的离体处理 取花粉母细胞减数分裂时的幼穗 (VI), 分别用 3 mmol/L KCN 和 2 mmol/L SHAM (用 0.05 mol/L pH6.8 磷酸缓冲液配制) 室温处理 4 h 后, 按前文^[9]方法测定 $O_2^{\cdot-}$ 的产生速率与 MDA 含量及 SOD 活性。

H_2O_2 和 $H_2O_2 + FeSO_4$ 注射幼穗后的呼吸速率 剥离主穗, 对发育到雌雄蕊原基形成期的幼穗用 1% H_2O_2 , 1% $H_2O_2 + 10$ mmol/L $FeSO_4$ 分别注射, 每穗 1 ml, 注射后取幼穗测呼吸速率^[9]。

蛋白质含量按 Bradford 的方法测定^[9]。

2 实验结果

2.1 珍汕 97A 和珍汕 97B 的 $O_2^{\cdot-}$ 形成, MDA 含量, 总呼吸速率和抗氰呼吸速率

表 1 比较细胞质雄性不育系珍汕 97A 与其保持系珍汕 97B 的花粉母细胞减数分裂时期的幼穗及成熟花药的 $O_2^{\cdot-}$ 形成, MDA 含量和呼吸指标。可见雄性不育系的幼穗和花药的 $O_2^{\cdot-}$ 形成, MDA 含量皆高于保持系的幼穗及花药, 这表明不育系的活性氧的产生增加, 且不育花药中 SOD 活性低于可育花药, 造成了不育花药中膜脂过氧化产物 MDA 的积累。同时可见不育花药的总呼吸速率及抗氰呼吸速率也较可育花药低, 显示不育花药的呼吸代谢也出现了异常。

表 1 珍汕 97A (A) 及珍汕 97B (B) 的 $O_2^{\cdot-}$ 形成, MDA 含量, SOD 活性, 总呼吸速率 (Vt) 和抗氰呼吸速率 (Valt)
Table 1 $O_2^{\cdot-}$ formation, MDA content, SOD activity, total respiratory rate (Vt) and alternative respiration (Valt)
of CMS rice Zhenshan 97A (A) and its maintainer Zhenshan 97B (B)

材料 Materials		$O_2^{\cdot-}$ (nmol mg ⁻¹ Pro min ⁻¹)	MDA (μ mol g ⁻¹ FW)	SOD (U g ⁻¹ FW)	总呼吸速率(Vt) (μ mol O ₂ g ⁻¹ FW h ⁻¹)	抗氰呼吸速率(Valt) (μ mol O ₂ g ⁻¹ FW h ⁻¹)
幼穗	A	1.6 ± 0.4	9.2 ± 1.3	104 ± 13	38.3 ± 5.7	3.4 ± 0.7
Panicle	B	1.3 ± 0.5	6.1 ± 0.9	105 ± 10	40.9 ± 6.4	3.5 ± 0.5
花药	A	3.9 ± 0.7	14.8 ± 2.1	800 ± 38	30.2 ± 8.2	1.5 ± 0.4
Anther	B	1.0 ± 0.2	2.9 ± 1.2	950 ± 27	42.3 ± 9.3	10.3 ± 2.5

2.2 KCN 与 SHAM 处理后的活性氧代谢

表 2 可见, 用 KCN 处理幼穗和花药后, 不育系与保持系的 O_2^- 形成都减少了, 但不育系的 O_2^- 的形成减少的百分率较多。而 SHAM 处理则使 O_2^- 的形成增加, 但不育系增加较多。

KCN 和 SHAM 处理后不育系与保持系幼穗和花药的 MDA 含量都升高, 但 KCN 使保持系升高较多, 而 SHAM 则使不育系的 MDA 含量升高较多。KCN 处理后不育系与保持系的 SOD 活性都明显受到抑制, 但 SHAM 处理对 SOD 活性影响不大。

2.3 H_2O_2 和 $H_2O_2 + FeSO_4$ 注射后的呼吸速率

图 1 示用 1% H_2O_2 和 1% $H_2O_2 + 10 \text{ mmol/L } FeSO_4$ 注射幼穗后, 珍汕 97A/B 幼穗的呼吸速率。可见仅用 H_2O_2 处理, 其对不育系与保持系的呼吸速率影响很小; 但在 H_2O_2 中加上 Fe^{2+} 后, 则可明显影响幼穗的呼吸速率, 但不育系与保持系间没有差异。这种抑制作用在注射后第 2 天最大, 到第 6 天抑制作用解除。

表 2 KCN 和 SHAM 处理后珍汕 97A 和珍汕 97B 幼穗和花药的 O_2^- 产生, MDA 含量和 SOD 活性变化

Table 2 Changes of O_2^- formation, MDA content and SOD activity in young panicles and anthers of CMS rice Zhenshan 97A (A) and its maintainer Zhenshan 97B (B) after KCN and SHAM treatments

材料 Materials		处理后升降百分率 (%) Percentage of increase (+) or decrease (-) after treatment			
		KCN(3 mmol/L)		SHAM(2 mmol/L)	
		幼穗 Panicle	花药 Anther	幼穗 Panicle	花药 Anther
O_2^-	A	-24.4	-30.3	+13.7	+15.7
	B	-10.5	-17.5	+7.1	+8.2
MDA	A	+3.8	+10.5	+16.5	+7.5
	B	+12.1	+27.3	+6.8	+3.1
SOD	A	-30.1	-57.3	+2.7	-1.2
	B	-26.8	-58.2	-1.3	+1.0

2.4 不同药剂对花粉育性的影响

在不育系与保持系主穗发育至雌雄蕊原基形成期时, 通过幼穗注射不同药剂 (2 mmol/L KCN, 1 mmol/L SHAM, 1% H_2O_2 , 1% $H_2O_2 + Fe^{2+}$, 50 mmol/L 丙二酸, 30 mmol/L Na_3PO_4 和 10 mmol/L GSH), 抽穗时 I_2 -KI 镜检花粉育性结果表明, 这些药剂对不育系的育性恢复和降低保持系花粉的可育性作用都不大。仅 KCN 和 1% $H_2O_2 + Fe^{2+}$ 注射可使保持系的花粉育性降低约 6% 和 8%。

3 讨论

呼吸代谢与活性氧的形成都涉及到电子传递到氧的问题, 前者将电子传递到氧形成 H_2O ,

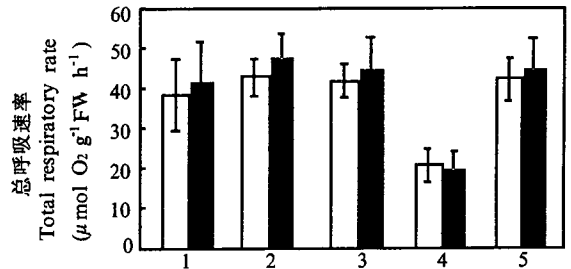


图 1 H_2O_2 和 $H_2O_2 + FeSO_4$ 注射后珍汕 97A (□) 和 97B (■) 的呼吸速率变化

Fig. 1 Changes of respiration in young panicle of Zhenshan 97A (□) and Zhenshan 97B (■) after H_2O_2 or $H_2O_2 + FeSO_4$ injection

1: 对照 Control; 2: 1% H_2O_2 处理后 2 d, 2 days after 1% H_2O_2 injection; 3: 1% H_2O_2 处理后 6 d, 6 days after 1% H_2O_2 injection; 4: 1% $H_2O_2 + 10 \text{ mmol/L } FeSO_4$ 处理后 2 d, 2 days after 1% $H_2O_2 + 10 \text{ mmol/L } FeSO_4$ injection; 5: 1% $H_2O_2 + 10 \text{ mmol/L } FeSO_4$ 处理后 6 d, 6 days after 1% $H_2O_2 + 10 \text{ mmol/L } FeSO_4$ injection.

而后者将氧单电子还原形成 $O_2^{\cdot-}$ ^[10]。Rich等^[11]和王爱国等^[1]都证实了线粒体呼吸时可产生 $O_2^{\cdot-}$, 分子氧进行单电子还原的位置是在呼吸链上的NADH-黄素蛋白和辅酶Q-细胞色素二个组份上。在本实验中我们用呼吸代谢电子传递阻断剂KCN和SHAM处理后, 可影响 $O_2^{\cdot-}$ 的形成, 再次证实了电子传递过程中可伴以氧的单电子还原。Boveris等^[2]指出植物线粒体产生 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 同交替呼吸有关, 但王爱国等^[1]则指出大豆下胚轴线粒体呼吸链内 $O_2^{\cdot-}$ 的产生为NADH所支持并与交替呼吸无关。本研究用SHAM处理水稻幼穗和花药后可增加 $O_2^{\cdot-}$ 的形成, 表明 $O_2^{\cdot-}$ 与细胞色素电子传递途径相关, 同时也说明交替呼吸的正常运转是有效减少呼吸电子传递途径中形成 $O_2^{\cdot-}$ 的必要条件。

但KCN阻断呼吸电子传递的细胞色素途径后, 不育系的 $O_2^{\cdot-}$ 形成减少幅度大于保持系, 这从一个侧面表明了正常电子传递过程中, 不育系更易于进行氧的单电子还原而形成 $O_2^{\cdot-}$ 。KCN虽可减少 $O_2^{\cdot-}$ 的形成, 但它同时也抑制了SOD的活性, 造成清除 $O_2^{\cdot-}$ 的不足, 最终还是使KCN处理后的幼穗中MDA含量升高(表2); 而SHAM抑制电子传递的抗氰呼吸途径后, 增加 $O_2^{\cdot-}$ 形成的同时并不影响SOD的活性, 因而SHAM处理后的幼穗和花药的MDA含量也相应增加了, 这说明了植物体内活性氧产生与清除之间协调进行的重要性。而且此处也支持了抗氰呼吸的可能作用之一就是可以在逆境条件下耗散细胞内的过多电子, 将之传递至 O_2 形成 H_2O , 减少 $O_2^{\cdot-}$ 的形成的可能^[12]。这也可能是不育系花药中的抗氰呼吸低下^[3-5], 不能有效地将细胞内过多的电子通过抗氰呼吸传递至 O_2 , 导致不育花药中 $O_2^{\cdot-}$ 形成较高^[6,7]的原因之一。

在用活性氧 H_2O_2 处理幼穗后, 它对呼吸速率的影响不大, 表明 H_2O_2 本身对呼吸的毒害作用较弱, 但也有可能是幼穗中的过氧化氢酶和过氧化物酶作用而将 H_2O_2 分解的结果。但当在 H_2O_2 中加入 $FeSO_4$ 后, 它对呼吸的抑制作用明显加强, 造成不育系与保持系幼穗呼吸速率的下降。 H_2O_2 在 Fe^{2+} 的存在下可发生Fenton反应^[13]而形成 $\cdot OH$, 它的毒害作用很大, 在不育系中发现有 H_2O_2 的积累^[7], 但根据本实验推测不育系中较高水平的 H_2O_2 并非直接起破坏作用, 而是和体内的 Fe^{2+} 等作用后形成毒性更强的 $\cdot OH$ 而起破坏作用。然而在处理6d不育系与保持系的呼吸速率都恢复到正常水平, 表明植物体有修复损伤的能力, 这可能是众多化学药剂处理后对花粉育性影响不大的原因。

参考文献

- 1 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 大豆下胚轴线粒体产生超氧化物自由基的效率. 植物生理学报, 1986, 12(2):148-153
- 2 Boveris A. Antimycin-and cyanide-resistant respiration and superoxide anion production in fresh and aged potato tuber mitochondria. FEBS Lett, 1978, 92:333-338
- 3 张明永, 梁承鄯, 黄毓文等. 水稻细胞质雄性不育系与保持系的呼吸途径比较. 植物生理学报, 1998, 24(1):55-58
- 4 夏涛, 刘纪麟. 玉米细胞质雄性不育性与组织抗氰呼吸关系的研究. 中国农业科学, 1988, 21(5):39-43
- 5 Musgrave M M, Antonovics J, Siedow J N. Is male-sterility in plants related to lack of cyanide-resistant respiration in tissues? Plant Science, 1986, 44:7-11
- 6 张明永, 梁承鄯, 段俊等. CMS水稻不同器官的膜脂过氧化水平. 作物学报, 1997, 23(6):603-606
- 7 陈贤丰, 梁承鄯. 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):44-48
- 8 林植芳, 梁承鄯, 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
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

- the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254
- 10 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 植物的氧代谢及活性氧对细胞的伤害. 中国科学院华南植物研究所集刊, 第五集. 北京: 科学出版社, 1989, 11-23
 - 11 Rich P R, Bonner W D Jr. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Biochem Biophys Acta*, 1978, 188:206-213
 - 12 Purvis A C. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol Plant*, 1997, 100:165-170
 - 13 Cadenas S K N. Role of ABA in stamen and pistil development in the normal and solanidolia mutant of tomato (*Lycopersicon exculentum*). *Sex Plant Reproduct*, 1991, 4:279-283