成花光敏感的雌雄性不育苎麻活性氧代谢研究

刘恒蔚[1], 牛　英[2], 周瑞阳[2]

(1. 长江大学 生命科学学院, 中国湖北 荆州 434025; 2. 广西大学 农学院, 中国广西 南宁 530005)

摘　要: 为研究成花光敏感雌雄不育苎麻(Floral initiation photo-sensitive male and female sertile ramie, SMSFS)的败育与活性氧代谢的关系, 对 SMSFS 及其回复突变株 SMSFS(R) 花器官的活性氧 (ROS) 清除酶活性和丙二醛 (MDA) 含量测定 . 结果表明: SMSFS 蕾的过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性明显高于可育株 SMSFS(R), 而膜脂过氧化产物 MDA 的含量低于 SMSFS(R); 与蕾期相比, 败育期 SMSFS 雌雄花除 POD 活性有所上升, 而 SOD 和 CAT 活性则显著下降, MDA 含量升高并高于开花期可育株 . 可见活性氧代谢的失衡引起了的膜脂过氧化, 与 SMSFS 雌雄性败育明显相关 .

关键词: 苎麻; 不育性; 活性氧

中图分类号: Q945. 6; S563. 1　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1007-7847(2005)02-0145-05

Metabolism of Reactive Oxygen Species in Floral Initiation Photo – sensitive Male and Female Sterile Ramie

LIU Heng-wei[1], NIU Ying[2], ZHOU Rui-yang[2]

(1. *College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou* 434025, *Hubei, China*; 2. *College of Agrinomy, Guangxi University, Nanning* 530005, *Guangxi, China*)

Abstract: The activities of reactive oxygen species(ROS) scavenger enzymes and the content of malondialdehyde (MDA) in the flowers of the floral initiation photo-sensitive male and female sterile ramie (SMSFS) and its reverse mutant strain SMSFS(R) were tested individually to study the relationship between sterility and ROS metabolism of SMSFS. The results showed that at bud stage, SMSFS buds had higher peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, but lower contents of MDA produced by membrane lipid peroxidation than SMSFS(R). In female and male sterile flowers, the SOD and CAT activities were declined distinctly except POD activities increased. But the content of MDA was increased and was higher than that in SMSFS(R) flowers. The results indicated that membrane lipid peroxidation, which was contributed to the breaking of the balance of the ROS metabolism was related to sterile induction.

Key words: Ramie(*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.); sterility; reactive oxygen species

(*Life Science Research*, 2005, 9(2): 145 ~ 149)

收稿日期: 2004-12-14; **修回日期**: 2005-01-24

基金项目: 湖北省教育厅重点科研项目(2000B05011)

作者简介: 刘恒蔚(1974-), 男, 湖北十堰人, 长江大学讲师, 硕士, 主要从事植物生物技术研究, E-mail: magichwl@ hotmail. com; 牛英(1977-), 女, 湖北襄樊人, 广西大学博士研究生, 主要从事麻类生物技术研究 .

近年来新发现的多种类型的雌性不育苎麻材料,其中有的表现稳定的雌性不育性,有的表现光周期敏感不育,在苎麻无籽育种的研究中具有重要意义[1,2].成花光敏感雌雄不育株(floral initiation photosensitive male and female sterile ramie, SMSFS)表现成花对光周期的敏感性,仅三麻开花,开花较晚且雌雄均不育,不育性稳定,尚未发现育性对光温敏感;其败育发生晚但彻底,雄花长到正常大小并逐渐脱落,雌花花柱可发育到正常长度后逐渐枯死.其回复突变株 SMSFS(R)是在 SMSFS 材料中发现的一个单蔸(株),其部分麻茎雌雄育性均已恢复正常可育,经鉴定为回复突变株,即 SMSFS(R).这一发现为研究苎麻雌雄性败育机理提供了极合适的材料体系.关于活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)伤害与雄性不育关系的研究,在水稻雄性不育的研究中已有详细的报道[3~9],认为活性氧伤害与诱导水稻雄性败育密切相关.本研究以 SMSFS 苎麻及其回复突变株 SMSFS(R)的花器官为材料,以 ROS 清除酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)的酶活性和膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量在蕾期与败育期以及在可育与败育株之间的差异为指标,探讨苎麻雄雌性败育与活性氧代谢的关系.

1 材料与方法

1.1 试验材料

成花光敏感雌雄不育株 SMSFS,以其回复突变株 SMSFS(R)作为对照.

1.2 取样及处理

取样:取样时间为每日上午 8 时.选择生长良好、株高和花期一致、雌雄花节数相近的单株,每材料每处理每次 5 至 8 株,将同节位花(蕾)器官合并.节位较多时取雌花茎段、雄花茎段和雌雄同序段的最上和最下节位,中间隔节取样.为便于研究,将雌雄花的发育时期粗略分级,并用编号表示(表 1).

表 1 雌雄花(蕾)发育时期的分级方法

Table 1 Dividing of developing stages for male and female flowers (buds)

花(蕾)的位次 Flower (bud) gradation	不育花(蕾)的发育时期 Sterile flower (bud) developing stages	可育花(蕾)的发育时期 Fertile flower (bud) developing stages
A1	雌性始蕾	雌性始蕾
A2	雌性现蕾	雌性现蕾
A3	雌花败育初步表现	雌花柱头伸长(雌花盛开)
B2	雌雄同序节位现蕾期	雌雄同序节位现蕾期
B3	雌雄同序节位雌雄花败育初步表现	雌雄同序节位雌雄花均开放
C2	雄花现蕾期	雄花节位现蕾期
C3	雄花败育初步表现	雄花散粉(盛开)

注:从 A1 至 C3 也表示自植株梢部到基部的顺序.

Note: The gradient from A1 to C3 also stands for the order of the buds (flowers) from top to base of the plant.

样品预处理:将所取样品洗净,吸水纸吸干水分,于 4 ℃冰箱预冷,各样品同节位花器官取大约相同大小合并,除去花梗,称取 0.5 至 1.5 g.以 4 ℃预冷的 0.1 mol/L, pH 7.8 磷酸缓冲液为提取介质,以 1 g:10 ml 的比例加提取液冰浴研磨匀浆.匀浆液用 4 ℃, 15 000 r/min 离心 10 min,取上清液作粗酶液保存备用.

1.3 测定方法

SOD 活性按改进的邻苯三酚自氧化法[10],酶活性以 $\Delta OD_{325nm}/(mg \cdot min)$ 表示,活性单位以 U 表示,即 $U=\Delta OD_{325nm}/(mg \cdot min)$; POD 活性按 Kochba(1977)方法[11], $U=\Delta OD_{470nm}/(mg \cdot min)$; CAT 活性用紫外分光光度法[12]测定, $U=mgH_2O_2/(mg \cdot min)$. MDA 含量按文献[13]的方法测定,以 nmol/g FW 表示;粗酶液蛋白质含量按 Bradford 法[14]测定,以牛血清蛋白为标准.每样品测定重复 3 次取平均值.

2　结果与分析

2.1　SMSFS 苎麻现蕾期不同节位活性氧代谢特征

2.1.1　POD 活性的节位梯度

如图 1 所示, 在 SMSFS 雌蕾茎段, 蕾的 POD 活性中自梢部而下逐渐降低, 但始终远高于 SMSFS(R). 自雌雄同序节位而下, 可育株与败育株均有所升高, 可育株 SMSFS(R)由 3.61 U 上升到 357.055 U, 向下在雄花始节位又上升到 1 255.305 U, 而败育株 SMSFS 由628.417 U 跃升至7 364.252 U, 表现为从雌蕾末节到雌雄同序节位的急剧上

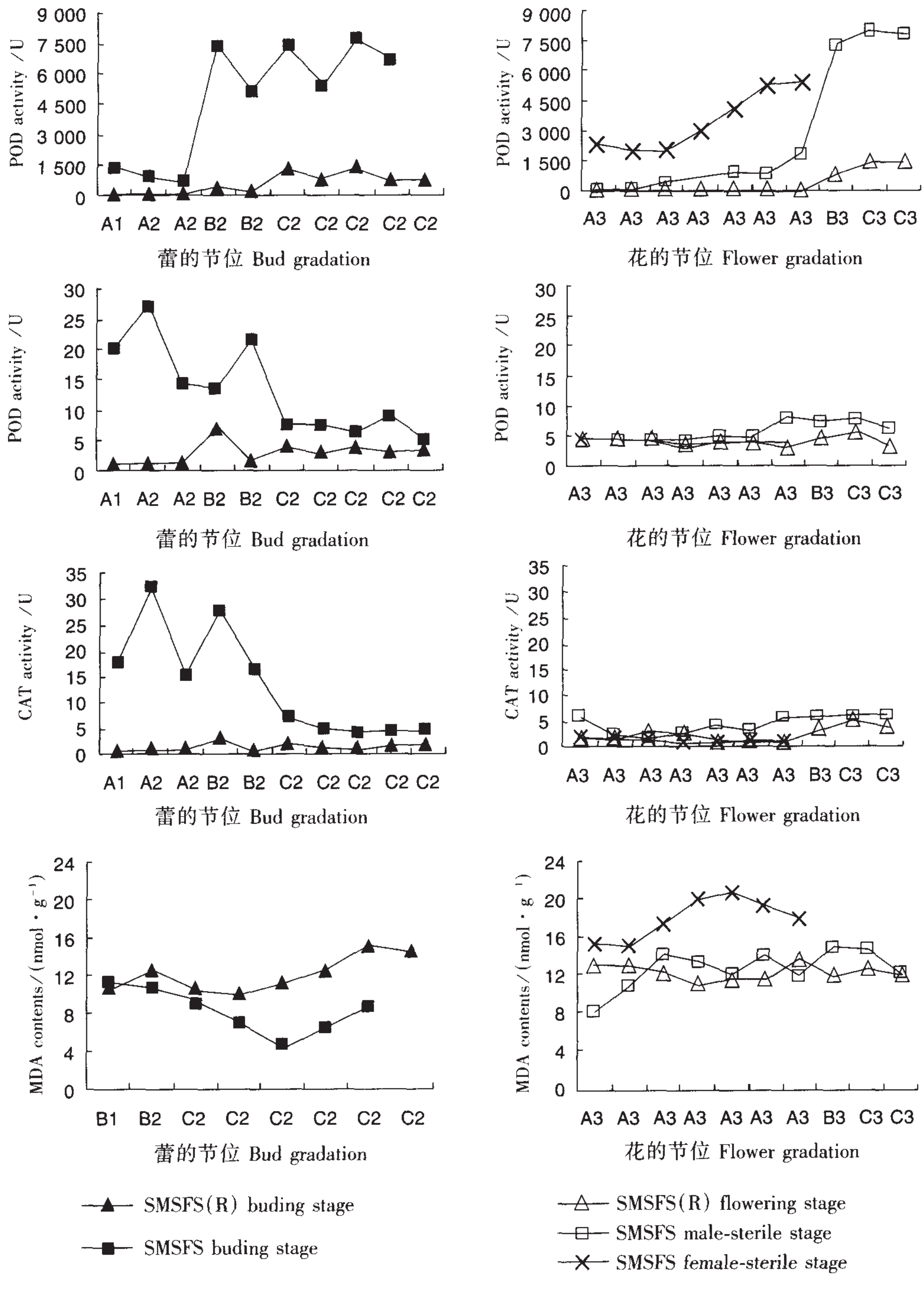

图 1　SMSFS 苎麻花器官活性氧相关酶(POD,SOD,CAT)活性及 MDA 含量的比较

Fig. 1　Comparisons of the activities of enzymes (POD, SOD, CAT) and the MDA contents gradient in SMSFS Ramie buds and flowers

升, 在雄蕾茎段始终维持在较高的活性水平. 败育株 SMSFS 花器官中 POD 活性显著高于可育株 SMSFS(R), 特别是现蕾期雄蕾中 POD 活性剧烈升高与败育株雄性败育比雌性早是密切相关的.

2.1.2 SOD 和 CAT 活性的节位梯度

蕾期 SOD 和 CAT 活性变化相似, 败育株 SMSFS 均表现为梢高基低的规律. 雌蕾茎段酶活性较高且波动较大, 在雌雄同序的节位出现跃变, 酶活性急剧降低, 雄蕾茎段酶活性低而平稳. 可育株 SMSFS(R)节位间变化和缓平稳. 所有节位均以败育株 SMSFS 活性高, 在雌蕾茎段更加显著.

与 POD 活性的节位间差异相比, 败育株花器官中 SOD 和 CAT 梢高基低, 而 POD 活性梢低基高, 都在雌雄同序的节位发生跃变. 反映了雌雄花败育过程 ROS 代谢的差异, 但无论雌雄花均是败育株高, 可育株低.

2.1.3 MDA 含量的节位梯度

蕾期败育株 SMSFS 的 MDA 含量明显比可育株低, 雄花更甚.

由以上结果所反映的 SMSFS 与 SMSFS(R)之间 POD、SOD 与 CAT 的活性和 MDA 含量的差异, 说明在蕾期不育株 SMSFS 已经表现了 ROS 代谢的异常, 但此期 ROS 的伤害尚未引起严重膜脂过氧化的发生, MDA 含量甚至低于正常水平, 这正是高活性的 ROS 清除酶 POD、SOD、CAT 作用的结果.

2.2 SMSFS 苎麻败育期不同节位活性氧代谢特征

2.2.1 POD 活性的节位梯度

如图 1 所示, 可育株与败育株的花器官的 POD 活性水平均具有自梢部向基部升高的趋势. 与蕾期相比, 可育株雌花 POD 活性并无显著变化. 不育株 SMSFS 在雄性败育期, 雄花 POD 活性和雌性败育期雌花 POD 活性均有所上升且均高于开花期可育株.

2.2.2 SOD 和 CAT 活性的节位梯度

开花期可育株雌雄花和败育期不育株雄花的 SOD 和 CAT 活性基本维持在蕾期水平, 变化不显著. 而不育株 SMSFS 在败育期雌花 SOD 和 CAT 活性由蕾期显著下降.

2.2.3 MDA 含量的节位梯度

可育株雌雄花 MDA 含量基本维持在蕾期水平. 而不育株雄花败育期的雄花和雌性败育期的雌花 MDA 含量均高于开花期可育株, 和蕾期相比, 升高也很明显. 这显示了败育的花器官中有活性氧导致膜脂过氧化作用的积累.

由以上结果可见, 可育株 SMSFS(R) 的 ROS 代谢从蕾期到开花期是比较稳定的, 而不育株 SMSFS 雌花 SOD 和 CAT 活性与蕾期相比显著下降, 这可能正是 ROS 持续伤害影响了 SOD 和 CAT 的活性或其表达, 因为败育的雌雄花比蕾期尚未败育的蕾含有较高的 MDA 显示存在膜脂过氧化的发生, 很明显这是由 ROS 代谢失衡引起的.

3 讨论

植物体的活性氧包括超氧物阴离子自由基($O_2^{\bar{\cdot}}$)、羟自由基($OH^{\cdot}$)、单线态氧($^1O_2$)、过氧化氢(H_2O_2), 脂质过氧化的中间产物 $RO^{\cdot}$、$ROO^{\cdot}$ 和 ROOH 等. 植物的 ROS 清除系统包括 ROS 清除酶如 POD、SOD、CAT 等和其它一些抗氧化剂如维生素 E、维生素 C、类胡萝卜素(CAR)等. SOD 是一种十分典型的诱导酶[15], 它的升高是植株细胞 $O_2^{\bar{\cdot}}$ 含量变化的晴雨表. ROS 若不能被及时清除将导致细胞的氧化胁迫, 引起生物大分子的氧化损伤和膜完整性的破坏[16, 17]. 虽然 ROS 在植物的抗病[18]和细胞增殖、分化、调亡及其信号转导等正常生理过程[19]中起重要作用, 但其量极微弱, 也极其短暂. ROS 及其清除系统之间的平衡对植物正常生长发育非常重要[20]. CAT 和 POD 能催化 H_2O_2 生成 H_2O 和 O_2, 避免毒害反应的发生. 而本研究中不育株 SMSFS 的 ROS 代谢异常变化, 必然影响植株体内一系列生理过程, 导致平衡关系的破坏.

本研究中可育株的 ROS 清除酶维持在蕾期水平; 而在败育期, 败育株花器官的 SOD、CAT 活性下降和 MDA 含量的上升, 与水稻[7, 21]油菜[22]玉米油菜[23]的雄性不育植物中研究结果是一致的. 在败育期雌雄花的 POD 活性上升, 也与水稻雄性不育的研究结果相类似[24, 25]. POD 对控制植物 IAA 水平起重要作用, 稳定的自由基可刺激 IAA 降解并与参与乙烯形成[26], 而农垦 58S 败育与 IAA 严重亏缺有关[27].

由此认为, SMSFS 在蕾期, 由于 ROS 的过量产生, 刺激了 ROS 清除酶活性的升高, 使膜脂过氧化水平(MDA 含量)甚至低于可育株; 而在败育期更多的 ROS 导致植株的 ROS 代谢平衡被打破, SOD、CAT 活性下降则使膜脂过氧化加剧, 可能由此导致了败育的发生. 同时也可能伴随 POD 有关

的激素水平的异常变化, 与此有关的败育机理还有待更深入研究.

参考文献(References):

[1] 周瑞阳. 苎麻雌性不育株的发现[J]. 中国农业科学(ZHOU R Y. The discovery of female sterile individuals in Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) [J]. Scientia Agricultura Sinica), 1996(5): 96.

[2] 周瑞阳. 苎麻雌性不育新的遗传分析 I. 表现型分类[J]. 中国学术期刊文摘(ZHOU R Y. Genetic analysis on female sterility in Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) I. The classification of phenotypes[J]. Chinese Science Abstracts), 1999, 5(8): 1053-1054.

[3] 梁承邺, 陈贤丰. 水稻不育系与其保持系花药中的内源多胺和抗氧化代谢[J]. 植物生理学报(LIANG C Y, CHEN X F. Polyamine contents and antioxidative metabolism in anthers of cytoplasmica male-sterile rice lines and their corresponding maintainer lines[J]. Acta Phytophysiologica Sinica), 1993, 19 (1): 82-88.

[4] 陈贤丰, 梁承邺. HPGMR 不育花药能量代谢, H_2O_2 的积累与雄性不育的关系[J]. 植物生理学通讯(CHEN X F, LIANG C Y. Relation of energy metabolism in HPGMR abortive anthers and accumulation of H_2O_2 to male sterility[J]. Plant Physiology Communications), 1991, 27(1): 21-24.

[5] 陈贤丰, 梁承邺. 水稻不育花药 H_2O_2 的积累与膜脂过氧化的加剧[J]. 植物生理学报(CHEN X F, LIANG C Y. Accumulation of hydrogen peroxide and lipid peroxidation in male-sterile anthers of *Oryza sativa*[J]. Acta Phytophysiologica Sinica), 1991, 17(1): 44-48.

[6] 林植芳, 梁承邺, 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[J]. 植物学报(LING Z F, LIANG C Y, SUN G C, *et al*. Microspore abortion and levels of organic free radicals in anthers of male-sterile rice[J]. Acta Agronomica Sinica), 1993, 35 (3): 215-221.

[7] 张明永, 梁承邺, 段俊, 等. CMS 水稻不同器官的膜脂过氧化水平[J]. 作物学报(ZHANG M Y, LIANG C Y, DUAN J, *et al*. Lipid peroxidation difference in leaves, panicles and anthers of CMS rice and maintainer[J]. Acta Agronomica Sinica), 1997, 23(5): 603-606.

[8] 邹国林, 刘俊松, 陈克成, 等. 光敏核不育水稻育性转变的敏感期超氧化物歧化酶与丙二醛的变化[J]. 武汉大学学报(自然科学版)(ZOU G L, LIU J S, CHEN K C, *et al*. The differences of superoxide dismutase activity and malondialdehyde concentration during the photoperiod sensitive stage of fertility changes in HPGMR[J]. Journal of Wuhan University (Nature Science Edition)), 1991 (4): 95-100.

[9] ZOU G L, CHEN K C, XIAO Y H. Metabolism of enzymes related to oxygen free radical during photoperid sensitive stage of fertility changes in PGMR[A]. XIAO Y H. Photoperiod and Physiology of Photoperiod-sensitive Genic Male-sterile Rice[C]. Wuhan: Wuhan University Press), 1993. 266-271.

[10] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测定方法[J]. 生物化学与生物物理进展(ZOU G L, GUI X F, ZHONG X L, *et al*. One method of testing SOD[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics), 1986, (4): 71-73.

[11] KOCHBA J, LAVE E S, SPIEGEL-ROY P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines[J]. Plant Cell Physiol, 1977, 18: 463-467.

[12] 王春台, 徐同, 刘学群. 紫外分光光度法测定过氧化氢酶的活性[J]. 华中农业大学学报(WANG C T, XU T, LIU X Q. Measurement of catalase activity with colorimetry of iodine[J]. Journal of Huazhong Agricultural University), 1987, 6 (1): 77-81.

[13] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京: 农业出版社(ZHANG X Z. Research Methods of Plant Physiology[M]. Beijing: China Agricultural Press), 1992. 215-216.

[14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.

[15] KAPPUS H. Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance[A]. SIES H. Oxidative Stress[C]. New York: Academic Press, 1985. 273-309.

[16] ELSTNER E F. Oxygen activation and oxygen toxicity[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1982, 33: 73-96.

[17] MORAN J F, BECANA M, ITURBE-ORMAETXE I, *et al*. Drought induces oxidative stress in pea plants[J]. Planta, 1994, 194: 346-352.

[18] 郭泽建, 李德葆. 活性氧与植物抗病性[J]. 植物学报(GUO Z J, LI D B. Active oxygen species in plant disease resistance[J]. Acta Botanica Sinica), 2000, 42(9): 881-891.

[19] 罗银铃, 宋松泉. 植物线粒体、活性氧与信号转导[J]. 西北植物学报(LUO Y L, SONG S Q. Plant mitochondria, reaction oxygen species and signaling transduction[J]. Acta Bot Boreal -Occident Sin), 2004, 24(4): 737-747.

[20] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制[J]. 生物工程学报(DU X M, YIN W X, ZHAO Y X, *et al*. The production and scavenging of reaction oxygen species in plants[J]. Chinese Journal of Biotechnology), 2001, 17(2): 121-125.

[21] 梁承邺, 陈贤丰. 湖北光周期敏感核不育水稻花药能量和活性氧的代谢[J]. 植物学报(LIANG C Y, CHEN X F. Energy and activated oxygen metabolisms in anthers of hubei photoperiod-sensitive genic male-sterile rice[J]. Acta Botanica Sinica), 1992, 34(6): 416-425.

[22] 张明永, 梁承邺, 段俊, 等. 油菜细胞质不育系发育进程中的活性氧代谢[J]. 植物学报(ZHANG M Y, LIANG C Y, DUAN J, *et al*. Study on activated oxygen metabolism in the cytoplasmic male sterility line and its maintainer of polima rape[J]. Acta Botanica Sinica), 1997, 39(3): 480-482.

[23] 段俊, 梁承邺, 张明永. 玉米细胞质雄性不育与膜脂过氧化的关系[J]. 植物生理学通讯(DUAN J, LIANG C Y, ZHANG M Y. The relationship between membrane lipid peroxidation and cytoplasmic male sterile in maize[J]. Plant Physiology Communications), 1996, 32(5): 331-334.

[24] 张明永, 梁承邺, 黄毓文, 等. 光(温)敏核雄性不育水稻育性转换中的幼穗和花药的某些生理指标变化[J]. 热带亚热带植物学报(ZHANG M Y, LIANG C Y, HUANG Y W, *et al*. Some physiological characters in panicles and anthers of photoperiod/ temperature-sensitive genic male-sterile rice (P/TGMR) during transferring from sterility to fertility[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany), 1994, 2(2): 71-76.

[25] 舒孝顺, 陈良碧. 温敏核不育水稻育性敏感期过氧化物酶活性[J]. 植物生理学通讯(SHU X S, CHEN L B. The activity of peroxidase in the thermo-sensitive genic male sterile rice during fertility-sensitive period[J]. Plant Physiology Communication), 1999, 35(6): 466-468.

[26] PARUPS E V. Free radicals and free radical scavenger effect on indole-3-acetic acid levels and ethylene production[J]. Physiol Plant, 1984, 60: 149-153.

[27] ZHOU X, ZHANG N G, WANG S B, *et al*. IAA deficiency and male sterility in rice. Abstract of 14th International Conference on Plant Growth Substance[J]. IPGSA Natherland, 1991, 85.