

油菜雄性不育系 160S 育性转换中保护酶活性变化*

沈亮余,李荣冲,王瑞雪,邹 燕,张 涛,龚慧明
(重庆师范大学 生命科学学院,重庆 400047)

摘要:以温度敏感型甘蓝型油菜雄性不育系 160S 为试验材料,并以可育油菜 31C 为对照,对 160S 育性转换过程中叶片和花药保护性酶的活性等进行了研究,研究中测定了 160S 在育性转换温度敏感时期超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等抗氧化酶活性以及丙二醛(MDA)含量。结果显示,160S 在育性转换期保护性酶活性降低,MDA 过量积累,而作为对照的可育油菜 31C 保护性酶活性较高,MDA 含量相对较低,以上差异和变化主要出现在花药中,表明不育系 160S 发生育性转换的一个重要因素是其花药中抗氧化酶活性系统产生了变化,使得活性氧自由基清除能力严重下降,从而进入活性氧自由基和 MDA 相互促进过量积累的不良循环。研究提示过量积累的活性氧自由基和 MDA 可能破坏了花药中细胞的膜结构,导致花药中花粉正常发育过程受阻而不能形成有活力的花粉母细胞,最终导致不育现象的发生。

关键词:温敏雄性不育;甘蓝型油菜;抗氧化酶;丙二醛

中图分类号:Q945

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2012)01-0082-05

雄性不育是高等植物中一种普遍的遗传现象,是作物杂交种杂种优势利用的基础,也是研究花粉发育、植物器官发生、细胞质遗传、核质互作和基因表达调控等科学问题的重要手段之一^[1-4]。目前油菜杂种优势中利用的雄性不育系统主要有细胞质雄性不育、细胞核雄性不育等,它们对杂交油菜的发展起了巨大的推动作用。然而该类不育系存在着不育性不是十分稳定、杂交种亲本选育受恢保关系和胞质负效应等的制约。有研究表明,温度敏感型雄性不育是一种特殊类型的不育材料:在不育温度条件下,该材料花粉发育受到抑制,不能形成具有生活力的花粉粒;在可育温度条件下,该材料花粉发育正常,可形成正常有生活力的花粉粒^[5-7]。

近年来,有关研究者在探讨植物雄性不育机理时,发现不育系中氧代谢发生了紊乱,活性氧过量积累,丙二醛(MDA)含量增高,造成植物膜结构损伤和生殖器官的特异性伤害,从而导致小孢子发育异常,形成不育^[8-10]。而油菜温度敏感型雄性不育育性转换过程中是否存在上述生理生化方面的变化,有关报道较少见到。因此,本研究对温度敏感型雄性不育油菜 160S 在育性转换温度敏感时期抗氧化酶活性以及 MDA 含量等变化进行了初步探讨,希望

为揭示生境因素对雄性育性基因表达的调控作用和油菜杂种优势利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为温度敏感型甘蓝型油菜细胞核雄性不育系 160S 和甘蓝型油菜 31C,均由重庆师范大学生命科学学院多年选育而成。不育系 160S 的理论不育转换温度为 22~25℃左右,当温度低于转换温度时育性正常,而当温度超过育性转换温度后其不育程度会随着温度的升高而加剧,直至完全不育。31C 是一个正常可用品系,它的育性非常稳定,不随外界环境的变化而改变,采用 31C 作对照可以清楚地研究正常可育油菜发育过程中某些生理生化指标的变化趋势,从而正确辨别温度对不育系生理生化指标变化的影响。

1.2 实验方案

1.2.1 温度对花药和叶片抗氧化酶活性及 MDA 含量的影响 本研究以 160S 理论不育转换温度此作为育性转换的临界点,分别选取了 18、23、26、32、13℃等 5 个检测点,测量 160S 和 31C 在 5 个温度点上的保护酶活性及 MDA 含量。以上 5 个取样点

* 收稿日期 2011-04-08 修回日期 2011-09-04 网络出版时间 2012-01-15 18:09:00

资助项目:重庆市高等教育教学改革研究项目(No. 103116)

作者简介:沈亮余,男,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学,通讯作者:张涛,E-mail:zht2188@126.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120115.1809.201201.83_015.html

图 2 160S 和 31C 叶片抗氧化酶活性及 MDA 含量

2.2 不同等级花药抗氧化酶活性及 MDA 含量的变化

由图 3 ~ 图 5 可知,在气温较低即 160S 的育性转换温度点前,随着花药的生长和不断成熟,160S 和 31C 的抗氧化酶活性呈小幅升高或降低趋势,活性相近;MDA 含量随着花药的发育变化不明显。而在育性转换点后采集的两种材料样品,此时的气温为 32 °C,远高于育性转换的温度要求,160S 已完全完成了可育向不育的转换。在此温度下,31C 4 个等级花药的酶活性差异不明显,而 160S 的 4 个等级花药的酶活性差异较大。此外,160S 花药的 MDA 含量随着花药的发育呈现上升趋势,而 31C 在各阶段 MDA 含量差异不明显(图 5)。以上结果表明,160S 和 31C 的抗氧化酶活性及 MDA 含量的差异主要出现在育性转换后,并且花药发育过程中一直存在。

3 讨论

植物在生长发育代谢和逆境环境胁迫下,都会产生大量的活性氧自由基并积累有害代谢产物,POD、CAT、SOD、APX 是 4 类重要的抗氧化还原酶,可以有效清除植物体内积累的活性氧自由基和有害代谢产物,维持体内活性氧代谢的平衡,从而保证植物的正常生长发育。此外,POD活性的强弱对植

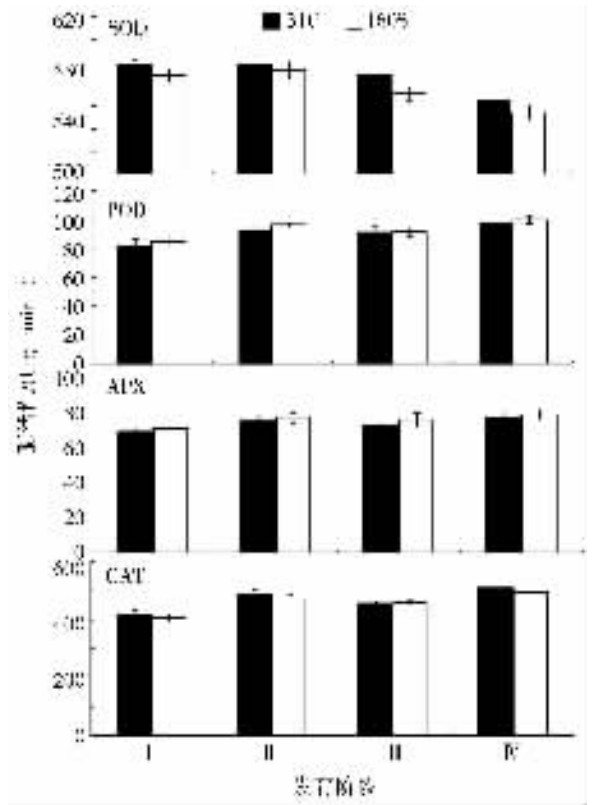


图 3 160S 和 31C 育性转换前花药的抗氧化酶活性

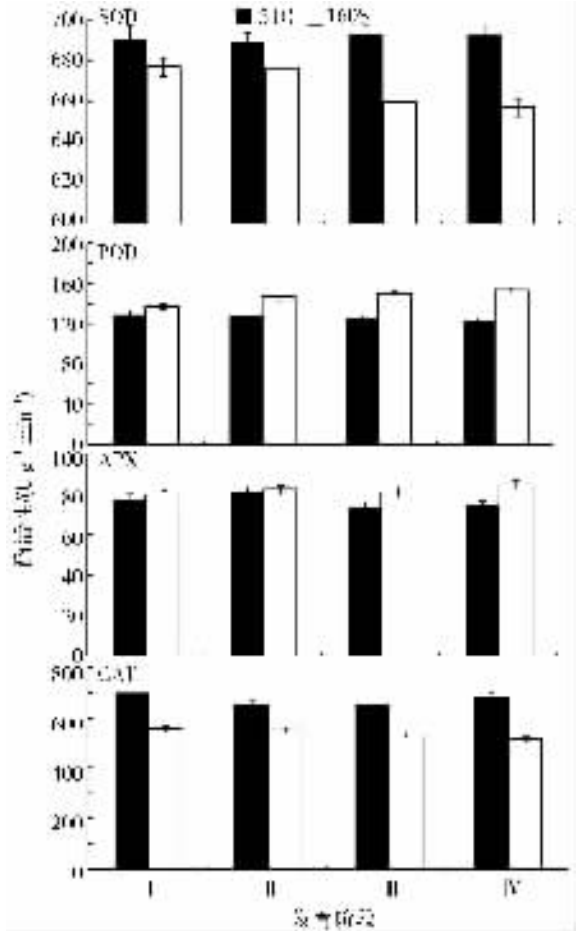


图 4 160S 和 31C 在育性转换后花药的抗氧化酶活性

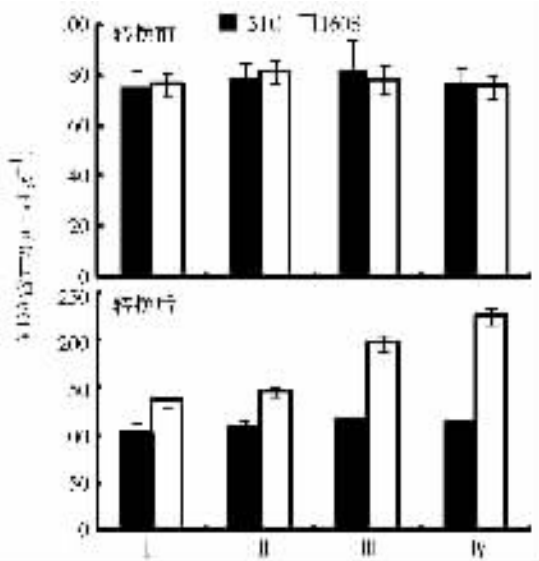


图 5 160S 和 31C 育性转换前后花药的 MDA 含量

物内源激素含量的平衡至关重要,而内源激素含量的高低直接关系到花药从其他组织或者器官调入营养物质,维持花药的正常代谢,如果内源激素含量异常将会造成花药营养物质的缺乏导致败育^[15-16]。MDA 在植物体内的含量是判断膜脂过氧化程度的一个重要指标,它是活性氧自由基破坏细胞膜脂结构所产生,当植物体内抗氧化酶系统被破坏后,MDA 含量会过量上升并且抑制细胞抗氧化保护酶的活性,进而加剧膜脂过氧化作用,导致生物体的严重损伤甚至死亡^[17-19]。POD、CAT、SOD、APX 这 4 种抗氧化酶相互协调作用共同防止氧自由基和 MDA 对植物造成的损伤,在花药发育成熟这一阶段,其中任何一种酶出现异常都会导致花粉粒的生长受阻,严重时直接致使花粉发育不良丧失育性,因此,膜脂过氧化增强是小孢子败育和花药不育的一个普遍特征^[20]。本研究发现,油菜不育系 160S 的抗氧化酶及 MDA 含量与 31C 在温度超过育性转换温度 25℃ 后出现较大差异,而这种差异在花药中尤为明显,在叶片中差异较小,而且随着花药的不断发育出现了与 31C 相反的变化趋势,这具体体现在温度升高过程中,160S 的 CAT、SOD 活性偏低,活性氧清除能力严重下降。综合 APX、POD 活性偏高可能导致的内源激素含量异常所带来的伤害效应^[15-16],本研究认为上述结果可能是造成 160S 抗氧化酶系统异常而最终导致花粉不能正常发育的一个重要原因。

在对抗氧化酶具体如何引起植物育性变化这一问题上存在很多争论,本研究初步推测:当温度较低

时,油菜 160S 花药产生的氧自由基较少,植物体内活性氧代谢平衡未被打破,保护酶系统能够有效地清除自由基使其对细胞的膜结构不至于造成严重伤害,此时表现为正常可育;当温度逐渐升高时,产生的氧自由基急剧增加并在花药中不断积累,最终超过了抗氧化酶的最大氧自由基处理能力,过量的氧自由基破坏了花药内细胞的膜结构并使细胞凋亡,最终导致不育现象的出现。从图 4~图 5 可以看出正常可育油菜 31C 的抗氧化酶系统的自由基处理能力远高于不育系 160S 体内的氧自由基能得到及时迅速的处理,故而不会大量积累。本研究中两种油菜的 MDA 含量比较也可间接证明上述观点:160S 和 31C 两种油菜在低温条件下 MDA 含量都维持在一个较低的水平,但 160S 花药的 MDA 含量在高温阶段不断上升积累,而 31C 花药的 MDA 含量和变化幅度都显著小于不育系。并且,不育系的育性转换不是在某个温度点上的突然变化,而是一个动态连续的过程,当不利因素积累到一定量时,植株才表现出不育的特性。同时,油菜不育系 160S 的育性转换过程中,遗传物质和环境因素的调控作用是一个有机的整体,植物内部存在一套完备应答机制,以应对外界条件变化和植物体内的遗传调控,在它生长过程中只有内外条件同时满足后才能表现为雄性不育,其中任何一种因子无论多高都不能代替对方的作用,这与前人的研究相符合^[21]。

参考文献:

- [1] Fu T D. Production and research of rapeseed in the People's Republic of China [J]. *Eucarpia Cruciferae News Letter*, 1981, 6: 6-7.
- [2] Fan Z, Stefansson B R. Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male-sterility system in rape (*Brassica napus* L.) [J]. *Can J Plant Sci*, 1986, 66(2): 221-227.
- [3] Yang L Y, Liu P W, Yang G S. Development of polima temperature sensitive cytoplasmic male sterile lines of *Brassica napus* through isolated microspore culture [J]. *Plant Breeding* 2006, 125(4): 1-4.
- [4] 曹双河,张相岐,张爱民. 光(温)敏雄性不育的调控机理和分子遗传学研究进展 [J]. *植物学通报*, 2005, 22(1): 19-26.
- [5] 杨光圣,傅廷栋,马朝芝,杨小牛. 甘蓝型油菜生态雄性不育两用系的研究 II. 环境条件对雄性不育两用系的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 1997, 16(5): 330-334.
- [6] 汤继华,胡彦民,付志远,等. 一种新型玉米温敏核雄性不育系的发现、鉴定及遗传分析 [J]. *中国农业科学*,

- 2007, 40(5) 889-894.
- [7] 李罗江, 茹振刚, 高庆荣, 等. BNS 小麦的雄性不育性及其温光特性[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9) :3019-3027.
- [8] Yuan J Y, Hou X L. Active oxygen metabolism in the floral buds and leaves of the new cytoplasm male sterile (CMS) line and its maintainer line of non-heading Chinese cabbage [J]. Frontiers of Agriculture in China 2007, 1 :47-51.
- [9] 文李, 刘盖, 张再君, 等. 红莲型水稻细胞质雄性不育花药蛋白质组学初步分析[J]. 遗传, 2006, 28(3) :311-316.
- [10] 危文亮, 王汉中. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育系 NCa 花药发育的细胞学观察[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6) :1232-1237.
- [11] Dhindsa R S, Dhindsa P P, Thorpe T A. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid-peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. Journal of Experiment Botany, 1980, 32(1) :93-101.
- [12] Cakmak I, Strboe D, Marschner H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds [J]. Journal of Experiment Botany, 1993, 44 :127-132.
- [13] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast[J]. Plant Cell Physiology, 1981, 22 :867-880.
- [14] Heath R L, Packer K. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. Journal of Experiment Botany, 1968, 32 :93-101.
- [15] Liochev S I, Fridovich I. Mechanism of the peroxidase activity of Cu, Zn superoxide dismutase[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 48 :12, 15.
- [16] Tang R S, Zheng J C, Jin Z Q, et al. Possible correlation between high temperature-induced floret sterility and endogenous levels of IAA, GAs and ABA in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Growth Regulation, 2008, 54(1) :37-43.
- [17] 周仲华, 朱四元, 陈金湘. 棉花温敏雄性不育与膜脂过氧化化的关系研究[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(4) :518-521.
- [18] 鲍思伟. 叶面施锰对豌豆膜脂过氧化作用及膜保护系统的影响[J]. 四川师范大学学报:自然科学版, 2009, 32(1) :103-105.
- [19] 鲍思伟. 叶面施锰对豌豆生物效应的影响[J]. 江西师范大学学报:自然科学版, 2005, 29(1) :77-80.
- [20] 付庆云, 曹银萍. 小麦光温敏雄性不育的研究和利用进展[J]. 麦类作物学报, 2010, 30(3) :576-580.
- [21] 曹双河, 张相岐, 张爱民. 光(温)敏雄性不育的调控机理和分子遗传学研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 22(1) :19-26.

Changes of Protective Enzyme Activities in Male Sterile Line 160S During Fertility Transformation

SHEN Liang-yu, LI Rong-chong, WANG Rui-xue, ZOU Yan, ZHANG Tao, GONG Hui-ming

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract : This research studied the activities of the protective enzyme in the leaves and anthers during the fertility transformation of the thermo-sensitive male-sterile line 160S of *Brassica napus* and selected the fertile rape as the contrast. The protective enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbate-peroxidase (APX) and malondialdehyde (MDA) content were measured. The results showed that the protective enzyme activities of 160S decreased and MDA content accumulated excessively during the fertility conversion, but the fertile line of 31C was of higher protective enzyme activity at the same temperature of the same period, while MDA content was relatively low and the anthers did not atrophy. Those differences of protective enzyme activity and MDA content accumulation were mainly occurred in the anthers of male sterile line 160S under natural temperature conditions. The results showed that one important factor of the fertility transformation of 160S probably was that anti-oxidation enzyme activities were abnormal which result in that the eliminating ability of reactive oxygen species decreased, and the reactive oxygen species and MDA accumulated excessively which probably destroyed the cell membrane. As a result, the pollens developed abnormally, then could not develop the pollen mother cell and behaved abortion traits eventually.

Key words : thermo-sensitive male sterility; *Brassica napus*; anti-oxidation enzyme; MDA