

·研究简报·

# 油菜细胞质雄性不育系发育进程中活性氧的代谢\*

张明永 梁承邨 段俊 黄毓文

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

关键词 油菜, 雄性不育, 活性氧

## STUDY ON ACTIVATED OXYGEN METABOLISM IN THE CYTOPLASMIC MALE STERILITY LINE AND ITS MAINTAINER OF POLIMA RAPE

Zhang Ming-yong, Liang Cheng-ye, Duan Jun and Huang Yu-wen  
(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650)

**Abstract** Metabolic changes of the activated oxygen in leaves of the "polima" rape (*Brassica napus* L.) between the cytoplasmic male sterility (CMS) line and its maintainer during various developmental stages were compared. During the vegetative developmental stage, lower efficiency of  $O_2^-$  formation, higher  $H_2O_2$  and malondialdehyde (MDA) contents and higher activity of superoxide dismutase (SOD) were found in the CMS than in the maintainer line, but difference in peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities were very little. During the stem elongation and flowering stages, the CMS had higher efficiency of  $O_2^-$  production, higher contents of  $H_2O_2$  and MDA, lower activities of SOD, CAT and POD than the fertile line. It is concluded that the trend of different changes in activated oxygen metabolism may be associated with pollen abortion in rape.

**Key words** Rape, Male sterility, Activated oxygen

为进一步认识活性氧代谢同雄性不育的联系, 本文研究了油菜不同生长发育时期不育系与保持系的活性氧代谢的差异。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料与取材

选用甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) "Polima" 细胞质雄性不育系 (CMS) 与保持系, 种子由华中农业大学博廷栋教授提供。于 1994 年冬季分 3 批种植于本研究所试验地。分别于营养生长期与生殖生长期各分 3 次取最上两片展开叶片。营养生长期取样时间为播种后 59、83 和 103 d 时; 生殖生长期则于抽苔期 (125 d)、减数分裂期 (134 d, 按李栒<sup>[1]</sup> 的标准检查花序上最大花蕾) 和成熟花粉期 (140 d) 取样。

#### 1.2 超氧物自由基 ( $O_2^-$ ) 等的检测

$O_2^-$  的产生按 Elstner 和 Heupel<sup>[2]</sup> 的方法略加修改, 反应显色后用乙醚去色素。 $H_2O_2$  含量按林植芳

收稿日期: 1995-07-24 接受日期: 1996-01-12

\* 广东省自然科学基金资助项目。

等<sup>[3]</sup>的方法略加修改,生成的过氧化物 Ti 复合物用冷丙酮悬浮洗涤 3 次再用正丁醇洗涤 2 次。丙二醛 (MDA)含量按赵世杰等<sup>[4]</sup>修改的方法测定。

### 1.3 酶液的制备

将样品按 1:3(W/V)加预冷的提取液(0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 mol/L EDTA、0.5 mol/L 巯基乙醇、1% PVP 研磨),4 ℃下 12 000 × g 离心 20 min。

### 1.4 酶活性测定

SOD 活性按王爱国等<sup>[5]</sup>的方法。过氧化氢酶 (CAT)活性按蒋传英和王承德<sup>[6]</sup>的方法,以减少 0.1 OD/min 为一个酶活单位。过氧化物酶 (POD)活性按 Kochba 等<sup>[7]</sup>的方法,以增加 0.1 OD/min 为一个酶活单位。

### 1.5 蛋白质和叶绿素含量的测定

分别按 Bradford<sup>[8]</sup>和朱广廉等<sup>[9]</sup>的方法进行。

每次试验重复 3 次,取其平均值。

## 2 实验结果

### 2.1 不育系和保持系叶片中不同生长期的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生效率及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量

从表 1 可见营养生长期内保持系叶片中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生效率略高于不育系;但进入生殖生长期后,保持系叶片中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率逐渐变得低于不育系。而从幼苗到成熟花粉这段生育期内不育系叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量都高于保持系。但无论不育系还是保持系在从幼苗至花粉成熟期内 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量都逐渐下降。

表 1 不同发育期的 Polima 油菜不育系及保持系叶片的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量

Table 1 O<sub>2</sub><sup>-</sup> production efficiency, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA contents in leaves of Polima rape cytoplasmic male sterility (CMS) and its maintainer line during different developmental stages

	材料 Materials	营养生长期(播种后天数) Vegetative stages (days after sowing)			生殖生长期 Reproductive stages		
		59 d	83 d	103 d	抽苔期 Stem elongation stage (125 d)	花粉母细胞 减数分裂期 Pollen mother cell meiosis stage (134 d)	成熟花粉期 Mature pollen stage (140 d)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol·mg <sup>-1</sup> protein·20 min <sup>-1</sup> )	CMS	137.3±7.3	135.6±5.6	123.6±6.1	103.3±7.5	91.9±6.3	44.5±3.1
	Maintainer	143.7±7.7	144.6±5.3	135.0±7.5	73.4±8.3	75.8±5.2	43.8±2.7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μmol·mg <sup>-1</sup> Chl)	CMS	117.3±5.3	108.6±6.9	72.3±10.5	63.5±9.3	33.5±7.6	27.2±5.7
	Maintainer	107.3±6.1	79.5±9.3	60.2±8.7	51.6±5.2	22.6±5.3	20.8±4.2
MDA (μmol·g <sup>-1</sup> FW)	CMS	27.1±2.4	17.1±3.7	8.3±1.5	10.5±1.3	12.2±2.5	9.6±0.7
	Maintainer	22.7±3.1	12.9±2.5	3.9±2.1	7.3±0.9	8.8±1.7	8.9±1.2

### 2.2 不育系和保持系叶片不同生长期 SOD、CAT 和 POD 活性

营养生长期(59 d、83 d)保持系叶片中 SOD 活性低于不育系,而 CAT 与 POD 活性则差异较小(图 1)。在进入生殖生长期前(103 d),保持系叶片中 SOD 与 CAT 活性都变得比不育系高;而 POD 活性则仅在减数分裂期时表现为保持系高于不育系,其它发育时期差异不明显。3 种酶活性在减数分裂时保持系高出不育系最多,保持系减数分裂期时 SOD、CAT 和 POD 活性分别为不育系的 137.9%、135.1% 和 263.0%。

从营养生长期到生殖生长期 SOD 活性逐渐下降,而 CAT、POD 活性升高;SOD 活性最高的时期出现在苗期,CAT 则在减数分裂期,而 POD 则在抽苔期。

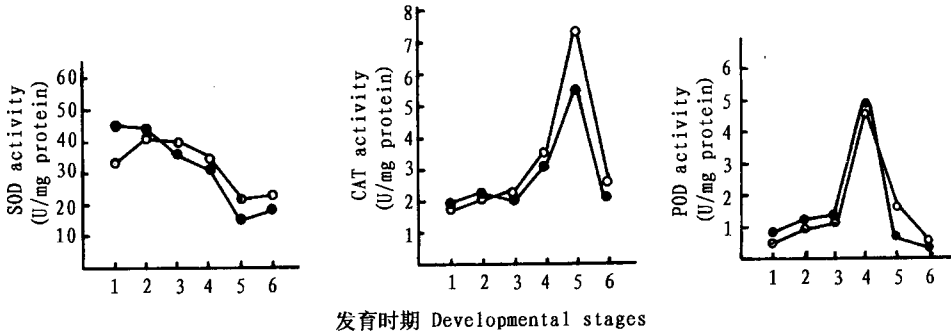


图 1 不同生长期的 Polima 油菜不育系(●)及保持系(○)叶片的 SOD、CAT 和 POD 活性  
1,2,3. 营养生长期,分别为播种后 59 d、83 d 和 103 d; 4. 抽苔期,为播种后 125 d; 5. 花粉母细胞减数分裂期,  
为播种后 134 d; 6. 花粉成熟期,为播种后 140 d。

Fig.1 Activities of SOD, CAT and POD in leaves of cytoplasmic male sterility line (●) and its maintainer (○) of Polima rape during different developmental stages

1,2,3. Vegetative stages, 59 d, 83 d, 103 d after sowing respectively; 4. Stem elongation stage, 125 d after sowing;  
5. Pollen mother cell meiosis stage, 134 d after sowing; 6. Mature pollen stage, 140 d after sowing.

### 3 讨 论

营养生长期时,油菜不育系与保持系相比, $O_2^-$  产生速率低而  $H_2O_2$  含量高,SOD 活性也较高,但 CAT 活性差异则不明显。表明不育系中 SOD 能迅速将  $O_2^-$  催化转变成  $H_2O_2$ ,但 CAT 不足以迅速清除  $H_2O_2$ ,从而造成不育系中  $H_2O_2$  积累,而  $H_2O_2$  又能在金属离子作用下产生羟自由基( $\cdot OH$ ),它是化学性质最活泼的活性氧,几乎能和生物体内的所有分子发生反应<sup>[10]</sup>。这样不育系叶片中  $H_2O_2$  的累积可能造成过多的  $\cdot OH$  形成,这有可能是造成不育系苗期 MDA 含量高于保持系的原因之一。当进入生殖生长后,不育系中由于 SOD、CAT 和 POD 活性(图 1)相对较低,造成了不育系中  $O_2^-$  与  $H_2O_2$ (表 1)的积累,这就更加剧了对不育系的伤害。从  $O_2^- \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ ,这一活性氧代谢过程来看,由于不育系中 SOD 和 CAT 活性的不协调造成活性氧清除的各中间代谢步骤的不协调,从而造成了不育系体内活性氧代谢的混乱。

### 参 考 文 献

- 1 李 梅. 油菜细胞遗传学研究 I. 油菜花粉母细胞减数分裂和小孢子发育规律的探讨. 中国油料,1984. 2:5~10
- 2 Elstner E F, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: A simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem*, 1976. 70:616~620
- 3 林植芳,李双顺,林桂珠等. 衰老叶片和叶绿体中  $H_2O_2$  的累积与膜脂过氧化物的关系. 植物生理学报,1988. 14:16~22
- 4 赵世杰,许长成,邹琦等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. 植物生理学通讯,1994. 30:207~210
- 5 王爱国,罗广华,邵从本等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报,1983. 9:77~84
- 6 蒋传英,王承德. 工具酶活力测定. 上海:上海科学技术出版社,1982. 36~38
- 7 Kochba J, Lave E S, Spiegel-Roy P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. *Plant Cell Physiol*, 1977. 18:463~467
- 8 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72:248~254
- 9 朱广廉,钟海文,张爱琴. 植物生理学实验. 北京:北京大学出版社,1990. 51~54
- 10 Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem*, 1989. 58:79~100