

Studies on the Relationship between Anther Development and Reactive Oxygen Balancing in *Xanthoceras sorbifolia* Bunge*

Shujing Zhang¹, Qiang Wang², Caixia Zheng^{1#}, Fenglan Li¹

¹College of Bioscience and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing

²Aquatic Biological Research Institute, China Science Academy, Wuhan
Email: #zhengcx@bjfu.edu.cn

Received: Jul. 5th, 2012; revised: Jul. 16th, 2012; accepted: Jul. 30th, 2012

Abstract: The balancing of the metabolism of reactive oxygen in male fertile anthers and male sterile anthers in *Xanthoceras sorbifolia* B. from microspore mother cells stage to binuclear stage was studied in this paper. The results indicated that the activity of SOD and CAT was inharmonious, and the content of Vc was less in the male-sterile anthers during their development, which cause the H₂O₂, MDA and organic free radical accumulating in the male-sterile anthers. As a result, the membranes of some important organelles such as mitochondria were destroyed. It result in the anthers sterile because of impact supply of energy and nutrient substance that anthers upgrowth needed.

Keywords: *Xanthoceras sorbifolia* B.; Anthers; Male Sterile; Metabolism of Reactive Oxygen

文冠果花药发育与活性氧平衡的关系*

张淑静¹, 王 强², 郑彩霞^{1#}, 李凤兰¹

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 北京

²中国科学院水生生物研究所, 武汉
Email: #zhengcx@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2012年7月5日; 修回日期: 2012年7月16日; 录用日期: 2012年7月30日

摘 要: 本文分析了文冠果不育和可育花药自小孢子母细胞至双核花粉粒发育期间的活性氧的平衡性, 结果表明: 在发育过程中不育花药中的 SOD 与 CAT 活性不协调, Vc 含量低, 造成 H₂O₂、MDA 和有机自由基积累。这可使线粒体等重要细胞器膜破坏, 影响了花药发育能量的供应和营养物质的供应而最终导致花药不育。

关键词: 文冠果; 花药; 雄性不育; 活性氧代谢

1. 引言

文冠果(*Xanthoceras sorbifolia* Bunge)为无患子科(Sapindaceae)文冠果属植物, 具有绿化、观赏和药用的价值。因其种仁含油率高, 被视为我国重要的木本

能源植物。但文冠果开花量大, 结实率极低, 因而大大降低了文冠果作为能源植物资源的利用率。因此, 开展文冠果发育的机理研究, 对于提高文冠果结实率具有重要的意义。

植物发育的基础是细胞的生长和代谢, 细胞生长受基因表达、营养物质和植物激素等多种因素的调控及代谢水平的影响。活性氧(Reactive oxygen species,

*资助信息: 国家自然科学基金项目(39670619)。

#通讯作者。

ROS)是植物有氧代谢过程中的副产物,对植物生命活动具有利和弊的双重作用^[1]。正常条件下,生物体内活性氧产生和清除系统之间维持动态的平衡,但不利因素的胁迫会打破这种平衡关系,从而引起生物体内的生理的变化来适应变化了的环境^[2]。近 10 多年来,随着细胞信号转导研究的深入,人们发现 ROS 通过直接或间接作用调节细胞生长来控制植物的发育^[3,4],成为植物发育的重要调节剂^[5,6],其可作为植物激素信号的第二信使,调节离子通道活性和基因表达,并通过影响胞壁的结构与松弛性等调节细胞的生长^[7]。Sagi 等^[8]认为,除了调节细胞的生长外,ROS 还可能更为复杂的作用,如控制器官形成的启动和数量、发育和性别分化等,但还缺少直接的证据。目前国际上仅有少量的研究观察到 ROS 在伸长的花粉管中大量产生,以及可控制成熟果实的软化,对花器官和幼果的生长调控作用需要开展系统研究。逆境胁迫以及特殊的生理现象(如雄性不育的花药、花蕾败育)伴随着 ROS 代谢异常,细胞内 H_2O_2 、 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 与 $^1\text{O}_2$ 积累,导致细胞的膜受损,进而死亡^[9-13]。

对水稻^[14,15],油菜^[16],棉花^[17],枸杞^[18],葱^[19],小麦^[20,21]等雄性不育系的研究结果表明,雄性不育体系内活性氧由于代谢失衡而趋于积累,一般均会导致细胞膜伤害,这可能是引起小孢子发育异常和不育的原因。

文冠果为杂性花,雄花(不孕花)的花药可育,两性花(孕花)的花药不育^[22-24]。早期研究表明,文冠果两性花花药不育可能与花粉中某些细胞器的减少及代谢上的障碍造成花粉缺乏足够的营养物质等因素有关^[22],进而发现,不育花药内花粉粘连,花药壁不能开裂散粉^[23],花药中的部分花粉不能萌发,开花期的不育花药与可育花药的多肽表达存在差异^[25]。为了进一步揭示导致文冠果不育花药这种结构与功能异常的原因,本文研究了文冠果花药发育过程中活性氧的平衡关系。

2. 材料与方法

2.1. 材料

植物材料均为北京林业大学苗圃的成年文冠果植株,选取有代表性的 3 株,依据郑彩霞等^[22]和彭伟秀等^[23]的方法确定花药发育时期,分别采取不育花药

和可育花药后立即进行测定。有机自由基检测所用材料先用冷冻干燥机冻干,研磨成细粉末,然后上机检测。

2.2. 方法

酶液制备:取 0.5 g 植物材料在冰浴下用少量磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0)研磨提取,4℃, 10,000 r/min 离心 15 min,上清液即为酶制剂,蛋白质的含量测定参考 Bradford^[26]的方法。酶活性测定均以等量蛋白质控制酶液的加入量。每个样品设 3 个重复。

过氧化氢酶(CAT)活性测定:采用高锰酸钾滴定法。取适量酶液加入到反应体系(5 ml H_2O ; 4 ml 1% H_2O_2)中反应 10 分钟后,加 2 ml 10%的 H_2SO_4 ,用 0.01 mol/L 的高锰酸钾滴定。酶活性以 $\text{mg H}_2\text{O}_2 \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示。

过氧化物酶(POD)活性测定:采用愈伤木酚氧化法^[27],利用 Uvikon-180 的自动酶促反应速度扫描功能作出酶促反应曲线,以反应初速度作为酶促反应速度。酶活性以 $\Delta\text{OD} 470 \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示。

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定:采用 NBT 光化还原法^[28]。将对 NBT 的还原反应抑制到对照一半时所需酶量为一个酶活单位,酶活性表示为 $\text{u} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

丙二醛(MDA)含量测定:参考赵世杰等^[29]的方法,采取硫代巴比妥酸显色法。

抗坏血酸(Vc)含量测定:采用 2,6-二氯苯酚吲哚酚滴定法^[30]。

有机自由基的检测:参考 Mojović 等^[31]的方法,取冻干并研磨精细样品粉末约 50 mg,装入样品管,置于电子顺磁共振波谱仪(德国产 BRUKER, ER 200D-SRC 型)的微波腔中检测有机自由基。测定条件为:中心磁场(G)为 3385,25℃,扫描范围(G)为 200 G,时间常数为 200 ms,扫描时间为 200 s,调制幅度为 1 G,调制频率为 100 kHz,放大倍数为 1.6×10^5 ,微波功率为 200 mW,微波频率为 9.47 GHz。自由基水平由信号振幅(峰高)以 cm 表示。样品中的自由基水平可以表示为毫米振幅每毫克干重。

测定数据采用 SPSS17.0 软件分别进行单因子方差分析和多重比较。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3. 结果与分析

3.1. CAT 活性变化

CAT 活性的测定结果如图 1a 所示。在小孢子母细胞和四分体时期，两种花药的 CAT 活性都相对较低，且没有明显差异；至单核时期两者活性显著提高 ($P < 0.05$)，而且两者的 CAT 活性相近。到单核中期，不育的 CAT 活性维持前期水平，而可育花药的活性持续提高，显著高于不育的 ($P < 0.05$)；至双核时期，二者中的 CAT 活性均急剧下降，但是可育的活性仍稍高于不育的。不育花药发育后期 CAT 活性较低将会使花药中 H_2O_2 积累，进而影响花粉的正常发育。

3.2. POD 活性变化

由图 1b 看出，在花药发育的早期，POD 活性较高，随着发育逐渐降低，不育花药的 POD 活性始终高于可育花药的，这种差异至单核中期达显著水平 ($P < 0.05$)。

3.3. SOD 活性变化

对于简单的公式，可以直接以文本方式输入；对于复杂的公式，可以考虑使用公式编辑器，或者将公式制作成图片后插入文中。编辑公式的过程中要特别

注意减号与连字符的区别，前者较长，后者较短。在小孢子母细胞时期，可育花药的 SOD 活性显著高于不育花药的 ($P < 0.05$)，随着发育进程逐渐下降；至单核中期和双核时期，显著低于不育花药的 ($P < 0.05$)。不育花药的 SOD 活性在四分体阶段之前变化不显著，到单核时期有一个明显下降 ($P < 0.05$)，随后逐渐上升，并且显著高于可育花药的 (见图 1c)。这可能是因为不育花药在发育后期有较多的超氧化物需要清除，而 SOD 的过度作用也可导致花药发育后期 H_2O_2 的积累。

3.4. Vc 含量变化

图 1d 表明，在文冠果花药发育过程中，不育花药的抗坏血酸含量相对较低，而且在发育的各时期基本处在同一水平。而可育花药的含量则逐渐上升，花药发育后期增加显著 ($P < 0.05$)，几乎是不育花药的 3 倍。推测抗坏血酸在维持文冠果花药活性氧的平衡中具有重要作用。

3.5. 丙二醛含量变化

整个发育进程中，两种花药中 MDA 含量均趋于 V 型变化，不育花药的 MDA 含量始终高于可育

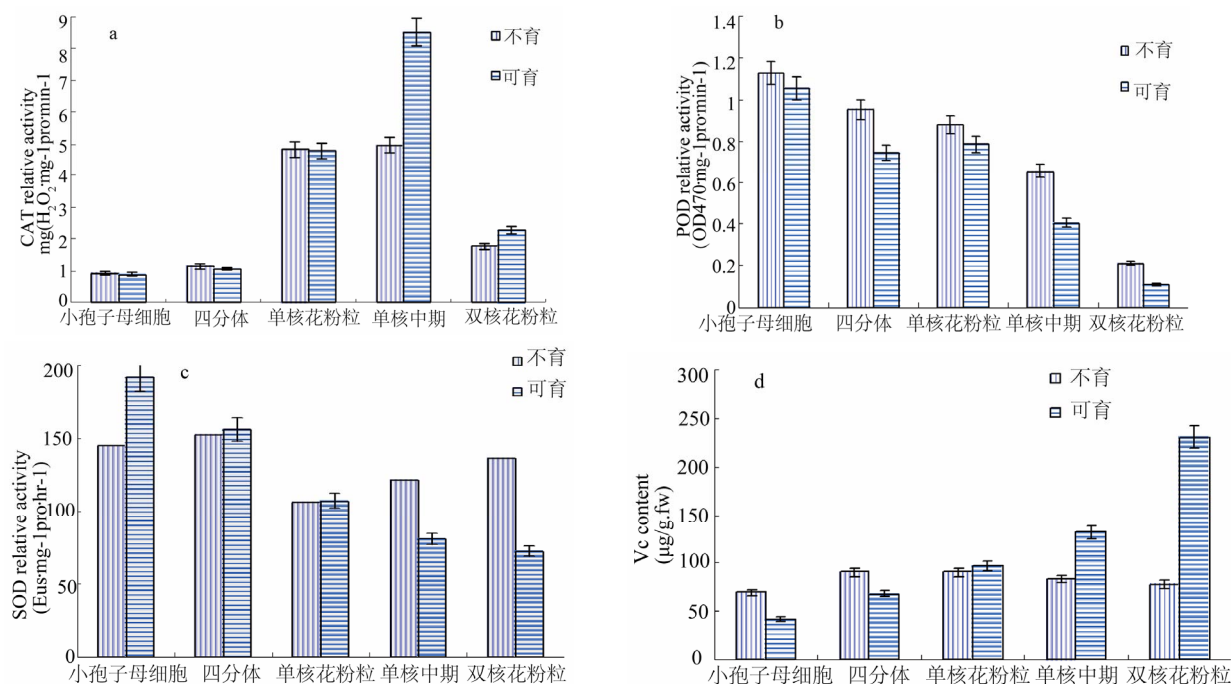


Figure 1. Changes of the activities of antioxidantase and the content of Vc during anther development in *Xanthoceras sorbifolia* Bunge

图 1. 文冠果花药发育过程中抗氧化酶活性及 Vc 含量的变化

花药的。至双核期在不育花药中有显著增加($P < 0.05$)。表明此刻不育花的膜脂过氧化程度较高(见图 2)。

3.6. 有机自由基的变化

花药发育过程中有机自由基的水平变化如图 3 所示。不育和可育的花药中自由基水平的变化规律一致,在单核时期均显著提高,达到高峰。在花药发育前期,可育花药的自由基含量明显高于不育花药的,但自单核时期之后,就转变为不育的高于可育的,并持续至花药发育成熟,但是差异没有早期那么显著。

4. 讨论

ROS 是氧的某些中间代谢产物及其衍生的含氧物质,具有比氧活泼的化学性质,主要包括单线态分

子氧(1O_2),过氧化氢(H_2O_2)和脂过氧化物(LOOH),自由基是指超氧化物阴离子($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot OH$ 和 $HO\cdot$)。实际上,氧自由基也是 ROS 的一部分。细胞中的有机态活性氧,如烷氧自由基($RO\cdot$),烷氧过氧化自由基($ROO\cdot$)可能是有机自由基的重要组成部分^[1,15]。生物体内存在一些清除它们的酶类和非酶类物质。前者如 SOD, POD 和 CAT, 后者如 Vc, 谷胱甘肽, 类胡萝卜素等。正常情况下这些自由基和 ROS 区域化地分布于细胞内,为植物生长和发育所必需,可通过调节细胞生长来控制植物的发育^[3]。人们常采用促进或抑制 ROS 产生的方法来研究 ROS 对植物发育的影响用。林植芳等^[6]在综述中介绍,如用 H_2O_2 处理后可改变植物基因的表达,一般一些编码抗氧化酶、氧化酶及木质素生物合成途径相关蛋白的基因表达被上调,而与胞壁软化有关的细胞壁扩展蛋白的基因表达则被下调,表明 ROS 可通过控制一些基因的表达来调节发育的程序。在不利的环境条件下,或植物趋于衰败的发育阶段,ROS 往往代谢异常,细胞内 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 与 1O_2 积累,如果不能被及时清除,可导致膜脂过氧化而产生大量的有机自由基,进而对细胞造成膜水平上的伤害,引起细胞代谢紊乱而死亡^[9,12,13]。许多研究表明氧自由基的积累可以抑制叶绿体的正常发育,降低其固定 CO_2 的能力;引起线粒体结构的损伤而导致其生化功能的丧失;膜脂过氧化的产物 MDA 又可直接引起植物细胞的毒害;氧自由基对生物大分子如蛋白质,酶,核酸等都有较强的毒害作用^[1,32]。

关于植物雄性不育和活性氧代谢之间的关系国内已有大量研究,表明活性氧代谢失衡与植物不育密切相关,膜脂过氧化作用增强是不育花药的普遍特征^[16-21]。

我们的研究表明,文冠果不育花药在发育早期 SOD 活性较低,不能有效地清除超氧化物自由基,单核期以后活性又提高,而同期 CAT 的活性又远低于可育花药,这种 SOD 和 CAT 活性的不协调性可能会造成 H_2O_2 的积累而导致花药发育异常。这与陈贤丰等^[14](1991)早期的研究结果相似,他们认为雄性不育的发生与不育花药能量代谢异常和 H_2O_2 的积累有关。王俊生^[20]用杀雄剂 SQ-1 处理能诱导小麦花药中 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 大量积累和 SOD、POD、CAT 等活性降低,

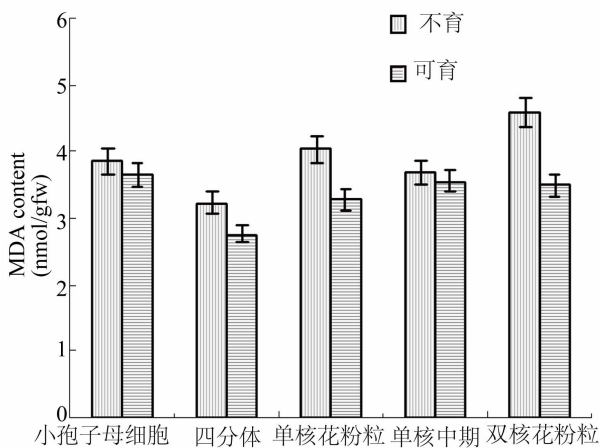


Figure 2. Changes of the content of MDA during anther development
图 2 文冠果花药发育过程中丙二醛含量的变化

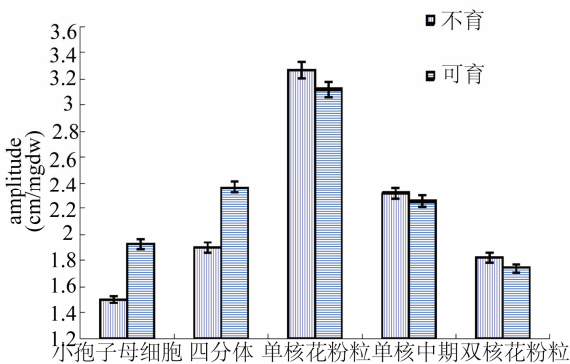


Figure 3. Changes of the level of organic radical during anther development in *Xanthoceras sorbifolia* Bunge
图 3 文冠果花药发育过程中有机自由基水平的变化

导致不育。蒋培东等^[17]研究发现,在棉花不育系败育初期的花药中 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和MDA的指标均高于保持系或杂种F1,同时SOD、CAT和POD活性也随着提高,认为败育初期花药的活性氧增加对抗氧化酶有诱导作用。

MDA在植物体内积累是活性氧毒害的结果,它的含量是判断膜脂过氧化程度的一个重要指标。文冠果不育花药中丙二醛含量始终高于可育花药,在双核期有明显的增量。表明不育花药细胞膜的伤害程度高于可育花药的,结果与米海莉^[18]对枸杞雄性不育系的研究结果一致。枸杞雄性不育株花蕾的MDA含量高于可育株的,MDA大量积累致使花蕾中花药发育不正常。苗锦山等^[19]对葱细胞质雄性不育系的研究结果也与之相同。葱雄性不育系从小蕾期开始,活性氧产生速率和丙二醛含量显著高于保持系,丙二醛含量从中蕾期开始大量积累,至败育盛期接近最高值。

Vc是活性氧的有效清除剂。庞勇等^[33]用还原型Vc处理能有效缓解植物细胞内丙二醛(MDA)含量的增加,可以有效降低氧化胁迫带来的细胞代谢损伤。文冠果不育花药的Vc含量在各发育时期相对较低,特别是在发育的后期其活性仅占可育花药的30%,这也是造成发育后期不育花药内MDA积累的原因。在文冠果花药发育前期,可育花药的有机自由基含量明显高于不育花的,但自单核期之后,就转变为不育花的高于可育花的,并持续至花药发育成熟。林植芳等^[15]在早期研究中指出,水稻细胞质雄性不育花药在发育过程中发生了有机自由基代谢异常。

植物体内叶绿体和线粒体中的代谢反应必然会导致 1O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的产生, $O_2^{\cdot-}$ 可被SOD歧化为 H_2O_2 ,这可引起更高毒性的 $\cdot OH$ 产生。 $\cdot OH$ 可攻击膜脂,产生RO \cdot 和ROO \cdot 等有机自由基,这些有机自由基不但是膜脂过氧化的产物,而且是膜脂过氧化更强的诱发剂,因此在体内膜保护中,CAT具有至关重要的作用,其他活性氧清除剂如Vc等亦具有重要作用。我们的研究表明,文冠果不育花药的败育与发育关键时期花药内SOD活性较高而CAT活性低及Vc含量低有密切的关系。至于这种活性氧代谢的异常现象是花药败育的原因还是结果,尚待进一步确定。我们在前期的研究中已经观察到不育花药线粒体等细胞器含量少且呈空泡状^[22],花药内花粉粘连,花药壁不能开

裂散粉^[23],认为这种现象可能与活性氧伤害膜结构有关。因此可以推测,文冠果不育花药中SOD与CAT活性的不协调,Vc含量低造成 H_2O_2 、MDA和有机自由基的积累,导致膜脂过氧化,致使线粒体等重要细胞器膜破坏,影响了花药发育能量的供应和营养物质的供应,最终导致花药不育。这个观点与前人的一致,也得到汪李宏^[21]和王俊生^[20]近期研究结果的支持。

参考文献 (References)

- [1] 王爱国,植物的氧代谢,余叔文,汤章城主编,植物生理与分子生物学第二版[M].北京:科学出版社,1998.
- [2] R. Mittler. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9): 405-410.
- [3] P. Schopfer, A. Liskay. Plasma membrane generated reactive oxygen intermediates and their role in cell growth of plants. *Bio Factors*, 2006, 28: 73-81.
- [4] C. Gapper, L. Dolan. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology*, 2006, 141: 341-345.
- [5] J. Bailey-Serres, R. Mittler. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*, 2006, 141: 311-311.
- [6] 林植芳,刘楠.活性氧调控植物生长发育的研究进展[J].植物学报,2012,47(1):74-86.
- [7] J. Foreman, V. Demidchik, J. H. F. Bothwell, P. Mylone, H. Miedema, M. A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J. D. G. Jones, J. M. Davies and L. Dolan. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 2003, 422: 442-446.
- [8] M. Sagi, O. Davydov, S. Orazova, Z. Yesbergenova, R. Ophir, J. W. Stratmann, R. Fluhr. Plant respiratory burst oxidase homologues impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell*, 2004, 16: 616-628.
- [9] E. Cadenas. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.*, 1989, 58: 79-100.
- [10] 王爱国,邵从本,罗广华,郭俊彦,梁厚果.活性氧对大豆下胚轴线粒体结构与功能的损伤[J].植物生理与分子生物学学报,1990,(1):13-18.
- [11] 陈少裕.膜脂过氧化对植物细胞的伤害[J].植物生理学通讯,1991,27(2):84-90.
- [12] 袁琳,克热木,伊力,张利权.NaCl胁迫对阿月浑子实生苗活性氧代谢与细胞膜稳定性的影响[J].植物生态学报,2005,(6):119-125.
- [13] 刘正鲁,朱月林,胡春梅,魏国平,杨立飞,张古文.氯化钠胁迫对嫁接茄子生长,抗氧化酶活性和活性氧代谢的影响[J].应用生态学报,2007,(3):537-541.
- [14] 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,1991,27(1):21-24.
- [15] 林植芳,梁承邺,孙谷畴,林桂珠.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,1993,35(3):215-221.
- [16] 张明永,梁承邺,段俊,黄毓文.油菜细胞质雄性不育系发育进程中活性氧的代谢[J].植物学报,1997,39(5):480-482.
- [17] 蒋培东,朱云国,王晓玲,朱伟,张小全,解海岩,王学德.棉花细胞质雄性不育花药的活性氧代谢[J].中国农业科学,2007,40(2):244-249.
- [18] 米海莉,张曦燕,樊云芳,李越鲲,曹有龙.枸杞雄性不育与植株发育进程中活性氧代谢的关系[J].江西农业大学学报,2008,30(5):796-798.
- [19] 苗锦山,杨文才,李美芹,沈火林.葱细胞质雄性不育与花蕾发育过程中活性氧代谢关系研究[J].华北农学报,2009,24(4):

- 92-95.
- [20] 王俊生. 小麦生理型雄性不育花药活性氧代谢和基因表达分析[D]. 西北农林科技大学, 2010.
- [21] 汪李宏. 生理型雄性不育小麦花药结构和活性氧变化的研究[D]. 西北农林科技大学, 2011.
- [22] 郑彩霞, 李凤兰. 文冠果两性花花粉败育原因的进一步研究[J]. 北京林业大学学报, 1993, 15(1): 78-84.
- [23] 彭伟秀, 王保柱, 李凤兰. 文冠果败育花药和花粉发育的解剖学研究[J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(3): 35-37.
- [24] 张敏, 王颀, 张雷, 吕雪芹, 唐亮, 王莉. 文冠果雌雄花发育过程形态结构比较[J]. 电子显微学报, 2012, 31(2): 154-162.
- [25] 马凯, 高述民, 胡青, 程朋军, 吴江黛, 李凤兰. 文冠果雄蕊发育的解剖学及雄性不育蛋白的研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(5): 40-43.
- [26] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [27] 李合生, 孙群, 赵世杰等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [28] R. S. Dhindsa. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Exp. Bot*, 1981, 32: 93-101.
- [29] 赵世杰, 许长城. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207-210.
- [30] 蔡武城, 袁厚积主编. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [31] M. Mojović, M. Vuletić, G. G. Bačić and Z. Vučinić. Oxygen radicals produced by plant plasma membranes: An EPR spin-trap study. *Journal of Exp Bot*, 2004, 55: 2523-2531.
- [32] H. J. Rogers. Is there an important role for reactive oxygen species and redox regulation during floral senescence? *Plant, Cell and Environment*, 2012, 35: 217-233.
- [33] 庞勇, 马锋旺, 徐凌飞. 抗坏血酸对苹果组培苗耐热性的生理效应[J]. 果树学报, 2005, 22(2): 160-162.