

## 水稻减数分裂期幼穗激素、多胺和蛋白质对高温的响应

曹云英<sup>1,2</sup>, 陈艳红<sup>1</sup>, 李卫振<sup>1</sup>, 唐仙伯<sup>1</sup>, 赵华<sup>1</sup>, 王志琴<sup>2</sup>, 杨建昌<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>南通大学生命科学学院, 江苏南通226019; <sup>2</sup>扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室, 江苏扬州225009

**摘要:** 以籼稻‘双桂1号’(热敏感品种)和‘黄华占’(耐热品种)为材料, 研究减数分裂期高温胁迫对水稻幼穗内源激素、多胺积累和蛋白质表达的影响。结果表明: 在高温下, ‘黄华占’的受精率和饱粒率显著高于‘双桂1号’。高温引起了两品种幼穗中吲哚乙酸(IAA)及玉米素(Z)和玉米素核苷(ZR)减少, 脱落酸(ABA)含量增加, 且‘黄华占’的变化小于‘双桂1号’; 高温使两品种精胺(Spm)含量增加, ‘双桂1号’的腐胺(Put)和亚精胺(Spd)含量减少, 但‘黄华占’Put和Spd含量增加。两品种蛋白质表达对高温响应有差异, 这些差异蛋白质主要涉及氧化还原调控、糖酵解、氨基酸代谢、光系统和胁迫响应。‘黄华占’的氧化还原调控蛋白在高温下表达量较高。表明耐热品种在高温下受精结实较好与其较高的IAA、Z+ZR和游离多胺含量, 较低的ABA含量及高表达的氧化还原调控相关的蛋白有密切关系。

**关键词:** 水稻; 高温; 激素; 多胺; 蛋白质

## Responses of Hormones, Polyamines and Proteins in Young Panicles of Rice to High Temperature during Meiosis

CAO Yun-Ying<sup>1,2</sup>, CHEN Yan-Hong<sup>1</sup>, LI Wei-Zhen<sup>1</sup>, TANG Xian-Bo<sup>1</sup>, ZHAO Hua<sup>1</sup>, WANG Zhi-Qing<sup>2</sup>, YANG Jian-Chang<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226007, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

**Abstract:** Using two rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) varieties, ‘Shuanggui No. 1’ (heat-sensitive) and ‘Huanghuazhan’ (heat-tolerant), as materials, the effect of high temperature during meiosis on hormones, polyamines accumulation and protein expression in young panicles of rice was investigated in this study. Under high temperature treatment, the fertilized-spikelet and filled-grain percentages were significantly higher in heat-tolerant variety than those in heat-sensitive one. Abscisic acid (ABA) content was increased by high temperature treatment, whereas indole acetic acid (IAA) and zeatin (Z) + zeatin riboside (ZR) contents were decreased. These hormone level changes were less obvious in ‘Huanghuazhan’ than those in ‘Shuanggui No. 1’. Spermine (Spm) levels in both varieties were up-regulated under high temperature. The levels of putrescine (Put) and spermidine (Spd) were decreased in ‘Shuanggui No. 1’ under high temperature, but they were increased in ‘Huanghuazhan’. Differences of protein expression in response to high temperature between the two varieties have been observed including proteins involved in redox regulation, glycolysis, amino acid metabolisms, photosynthesis and stress responses. Proteins related to redox regulation were preferentially expressed in ‘Huanghuazhan’ under high temperature treatment. In summary, our results indicate that, under high temperature, higher fertilized-spikelet and filled-grain percentages in heat-tolerant variety are closely associated with a higher concentration of IAA, Z+ZR and polyamines, and a lower concentration of ABA and higher expression of proteins involved in redox regulation in young panicles of rice during meiosis.

**Key words:** rice (*Oryza sativa*); high temperature; hormones; polyamines; protein

水稻是重要的粮食作物, 全球半数以上人口的主食, 水稻的生长过程受高温影响明显。花粉母细胞减数分裂期是水稻高温响应的敏感时期, 此时遭遇高温胁迫会使雌雄配子发育异常、颖花退化、受精不良、结实率降低, 进而严重影响产量(Matsui和Omasa 2002; 石春林等2008; 曹云英等2008)。不同基因型对高温的响应存在差异: 与热

敏感品种相比, 耐热品种因在高温下有更高的花

收稿 2015-07-31 修定 2015-10-07

资助 国家自然科学基金(31271641和31471438)、江苏高校优势学科建设工程专项(PAPD-2014)、江苏省科技支撑计划项目(BE2014411)和江苏省高校自然科学基金(13KJB210005)。

\* 通讯作者(E-mail: jcyang@yzu.edu.cn; Tel: 0514-87979317)。

药开裂、离体花粉萌发率和小穗育性(曹云英等2008; Rang等2011)而显示更高的受精结实率。对同一品种而言,雌蕊比雄蕊更能耐受温度胁迫(Hayase等1969)。目前温度胁迫对雌蕊影响的研究较少(Zinn等2010),更多的研究集中在雄蕊发育上(曹云英等2008; Tang等2008; Jain等2010)。高温使受精不良、结实率下降的原因比较清楚,但高温使花粉活性和花粉萌发率降低等的生理生化和分子机制还不太清楚(Matsui和Omasa 2002; Tang等2008)。

已有研究报道花药中蛋白质合成、内源激素和多胺在调控雄蕊发育方面起着重要的作用。热激蛋白的上调赋予了耐热品种在开花期高温胁迫下更高的抵抗能力(Jagadish等2010)。开花期花药中低水平的吲哚乙酸(IAA)和过量的脱落酸(ABA)及幼穗中过量的乙烯可能诱导了花粉不育(曹云英等2008; Tang等2008)。多胺可以调节植物的许多生理过程,包括逆境响应(Kusano等2008),如较低的S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC,多胺合成的关键酶)活性可能会导致花粉发育较差(Song等2002),但减数分裂期高温下水稻幼穗中上述相关指标是如何响应的目前仍不清楚。本研究旨在获得减数分裂期高温胁迫下不同耐热品种受精结实情况,明确水稻在减数分裂期高温处理下幼穗中的内源激素[IAA、玉米素(Z)、玉米素核苷(ZR)和ABA]、内源游离多胺[腐胺(Put)、亚精胺(Spd)、精胺(Spm)]含量的变化及通过双向电泳分离技术及质谱鉴定比较不同基因型幼穗中高温响应蛋白,分析它们和受精结实的关系。本文旨在进一步探明不同品种对减数分裂期高温响应的机理,明确耐热品种的生理特征,以期为选育耐热水稻品种提供依据。

## 材料与方法

### 1 供试品种与种植

试验于2010年和2011年在扬州大学江苏省作物栽培生理重点实验室盆栽试验场进行。供试材料为中熟籼稻(*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)耐热品种‘黄华占’和热敏感型品种‘双桂1号’。上述耐热和热敏感类型品种的划分主要依据品种本身的特性(广东省农科院水稻所水稻遗传综合技术育种研究

室1982; 周国峰等2011)和作者以前的研究确定(曹云英等2008, 2009)。材料种植于盆钵内,盆钵直径28 cm,高30 cm,内装过筛土约20 kg,含有机质24.2 g·kg<sup>-1</sup>、有效氮98.2 mg·kg<sup>-1</sup>、速效磷25.5 mg·kg<sup>-1</sup>、速效钾80.6 mg·kg<sup>-1</sup>。5月12~14日播种,6月6~8日移栽。每盆3穴,每穴2苗。移栽前每盆施2 g尿素,0.5 g磷酸二氢钾作基肥;移栽后一周每盆施0.5 g尿素;穗分化期每盆施0.6 g尿素。其他管理按常规高产栽培。‘黄华占’和‘双桂1号’的始穗期分别为8月5~6日和8月3~4日。

### 2 高温处理

当主茎穗进入减数分裂期时[参照丁颖(1961)的划分法,根据解剖幼穗确定],将放置于室外生长的盆钵移至人工气候室内进行高温处理,至始穗期(自10%植株开始抽穗)结束处理,并移至室外继续生长,以室外自然条件生长的盆栽水稻为对照,每处理20盆。人工气候室内模拟自然界变化规律进行温度控制,设定温度为6:00~8:00, 28.0 °C; 8:00~10:00, 33.0 °C; 10:00~14:00, 38.0 °C; 14:00~18:00, 33.0 °C; 18:00~次日6:00, 28.0 °C,温度控制精度±0.5 °C。设定恒湿50%,精度±5%。设定二氧化碳浓度、光照与外界保持一致。处理期间对照日平均温度分别为32.1 °C(昼)和25.8 °C(夜)。

### 3 受精率和产量分析

成熟期每一处理取6盆考种计产,分析千粒重、受精率、饱粒率和粒重等指标。

### 4 内源激素和多胺的提取、纯化和测定

自处理后3 d起取幼穗,每隔3 d取1次,共取样4次。所有材料取完后均置液氮中快速冷冻后于-80 °C冰箱中保存,用于Z、ZR、IAA、ABA和游离多胺(Put、Spd和Spm)的提取和测定。

激素的提取和纯化参照陈远平和杨文钰(2005)的方法,采用高效液相色谱法测定激素的含量。高效液相色谱仪(Waters-600,美国)的色谱柱为Dubhe反向柱(4.6 mm×250 mm,粒度为5 μm),流动相为甲醇-0.6%乙酸,流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为30 °C,检测波长254 nm,进样体积为10 μL,外标法进行定量,每个处理重复3次。幼穗中激素浓度用μg·g<sup>-1</sup>(FW)表示。

游离多胺的提取、纯化与测定参照Flores和Galston(1982)和DiTomaso等(1989)方法。高效液

相色谱仪(Waters-600, 美国)的色谱柱为Zorbax ODS反相柱(4.6 mm×250 mm, 粒度为5 μm), 流动相为甲醇:水=75:25 (V/V), 流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为30 °C, 检测波长为254 nm, 进样体积为20 μL, 1,6-己二胺作为内标, 每个处理重复3次。幼穗中多胺浓度用nmol·g<sup>-1</sup> (FW)表示。

## 5 蛋白质组学分析

### 5.1 蛋白质提取

按Wang等(2003)的方法提取幼穗中的蛋白质。用Bradford (1976)法测定蛋白质含量。

### 5.2 双向电泳与凝胶成像

双向电泳参考Görg等(1999)并稍作修改。一向固相pH梯度等电聚焦(IEF)采用11 cm pH 4~7固相pH梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条。加入约含1 000 μg蛋白质的样品。聚焦参数为20 °C, 250 V, 0.5 h; 1 000 V, 1 h; 8 000 V, 9 h; 500 V, 任意时间。第二向聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离胶浓度为12%, 考马斯亮蓝染色, 扫描仪扫描凝胶, 用PDQuest 7.3 (Bio-Rad, 美国)软件分析各处理幼穗蛋白质表达的差异情况, 获得高温相关的差异蛋白点。每个处理重复2次。

### 5.3 质谱鉴定

差异蛋白胶电泳碳酸氢铵-50%乙腈溶液进行脱色, 测序级胰蛋白酶进行酶解, 0.1%三氟乙酸-50%乙腈溶液提取, 真空旋转浓缩后送至扬州大学测试中心用MALDI-TOF/TOF质谱仪(ABI 5800, 美国)进行质谱鉴定, 确定目的蛋白质。

## 6 荧光定量PCR分析

高温响应蛋白基因的转录水平采用荧光定量

PCR分析。以高温处理后5 d的幼穗为RNA样品。采用RNeasy Plant Mini Kit试剂盒(Qiagen, 德国)提取幼穗RNA, 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。用M-MLV逆转录酶(TaKaRa, 中国)将总RNA转变成cDNA。用荧光PCR仪(ABI 7500, 美国)进行定量PCR分析, PCR反应体系总体积为20 μL, 其中包括2 μL稀释的cDNA模板, 10 μL 2×SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, 中国), 0.4 μL 50×ROX Reference Dye II (TaKaRa, 中国)及400 nmol·L<sup>-1</sup>引物。反应程序为95 °C, 30 s; 随后95 °C, 5 s; 60 °C, 30 s; 40个循环。*Actin*基因作为内参基因, 应用7500 Software 2.0.6软件分析获得相对定量 $\Delta\Delta C_t$ 值, 用于作图。每个处理重复4次。

## 7 数据分析

用SPSS 13.0软件进行统计分析数据, 用Duncan新复极差法进行处理间差异性检验( $P<0.05$ ), 用Sigmaplot 10.0绘制图表。

## 实验结果

### 1 减数分裂期高温对水稻受精和结实的影响

减数分裂期高温影响水稻受精, 导致结实率下降并最终影响产量。由表1可知, 减数分裂期高温使两品种受精率均显著降低, 其中‘双桂1号’降低了20.8%~27.2%, ‘黄华占’降低了6.9%~9.0%。受精率下降导致饱粒率(结实率)下降, ‘双桂1号’降低了10.5%~20.4%, ‘黄华占’则降低了4.5%~9.9%; 使空粒率增加(‘双桂1号’19.6%~26.2%, ‘黄华占’6.7%~10.1%), 但对瘪粒影响不大。另外, 高温明显使两品种粒重下降, ‘双桂1号’降低量为

表1 减数分裂期高温对水稻受精和结实的影响

Table 1 Effect of high temperature on the fertilized-spikelet percentage and seed-setting rate during meiosis

种植时间	品种	处理	空粒率/%	瘪粒率/%	饱粒率/%	受精率/%	粒重/mg·粒 <sup>-1</sup>	产量/g·盆 <sup>-1</sup>
2010年	‘双桂1号’	对照	5.9±0.3 <sup>c</sup>	5.5±0.4 <sup>a</sup>	88.6±0.9 <sup>b</sup>	94.1±1.0 <sup>a</sup>	21.3±0.5 <sup>a</sup>	92.6±4.8 <sup>a</sup>
		高温	25.5±0.3 <sup>a</sup>	4.0±0.3 <sup>a</sup>	70.5±3.8 <sup>c</sup>	74.5±1.9 <sup>c</sup>	20.0±0.7 <sup>b</sup>	51.2±4.2 <sup>c</sup>
	‘黄华占’	对照	3.5±0.3 <sup>c</sup>	5.3±0.3 <sup>a</sup>	91.2±1.4 <sup>a</sup>	96.5±1.6 <sup>a</sup>	20.8±0.3 <sup>a</sup>	98.1±7.4 <sup>a</sup>
		高温	10.2±0.3 <sup>b</sup>	2.7±0.3 <sup>a</sup>	87.1±1.7 <sup>b</sup>	89.8±2.1 <sup>b</sup>	20.1±0.5 <sup>b</sup>	83.7±5.8 <sup>b</sup>
2011年	‘双桂1号’	对照	6.3±0.3 <sup>c</sup>	5.5±0.3 <sup>a</sup>	87.2±2.6 <sup>b</sup>	92.7±2.8 <sup>a</sup>	20.9±0.1 <sup>a</sup>	86.8±7.3 <sup>b</sup>
		高温	32.5±0.3 <sup>a</sup>	4.6±0.3 <sup>a</sup>	62.9±0.6 <sup>c</sup>	67.5±1.5 <sup>d</sup>	18.7±0.3 <sup>c</sup>	52.6±3.9 <sup>c</sup>
	‘黄华占’	对照	2.8±0.3 <sup>c</sup>	3.7±0.3 <sup>a</sup>	93.5±5.9 <sup>a</sup>	97.2±4.0 <sup>a</sup>	20.6±0.2 <sup>a</sup>	96.8±4.6 <sup>a</sup>
		高温	12.9±0.3 <sup>b</sup>	4.3±0.3 <sup>a</sup>	84.2±0.1 <sup>b</sup>	88.5±3.4 <sup>b</sup>	19.4±0.7 <sup>b</sup>	78.3±5.5 <sup>b</sup>

成熟期每处理取6盆收获计产并分析空粒率、瘪粒率、饱粒率、受精率[(瘪粒+饱粒)/(空粒+瘪粒+饱粒)]和粒重, 其中饱粒的比重 $\geq 1$ 。表中数据为平均数±标准偏差, 每一列中不同字母表示在0.05水平上的差异显著性。

7.0%~10.5%，‘黄华占’为3.4%~5.8%。结实率和粒重的下降最终导致产量大幅度减少，‘双桂1号’减少了39.4%~45.9%，‘黄华占’则减少13.7%~19.1% (表1)。

从上述结果还可以明显看出，耐热品种‘黄华占’受高温影响相对较小，受精率、结实率和产量等指标的下降幅度均明显小于热敏感品种‘双桂1号’，说明高温胁迫下耐热品种具有较高的生理稳定性。

## 2 减数分裂期高温对水稻幼穗内源激素含量的影响

从图1可见，高温胁迫下两品种中Z+ZR和IAA含量均低于对照，且‘双桂1号’下降幅度大于‘黄华占’；ABA含量高于对照，‘双桂1号’增幅大于‘黄华占’。比较两品种高温下(Z+ZR+IAA)/ABA的含量，发现耐热品种‘黄华占’高于热敏感品种‘双桂1号’ (图1-D)，表明减数分裂期受高温胁迫耐热品种相

对较高的(Z+ZR+IAA)/ABA的激素水平有利于幼穗抵抗高温逆境。

## 3 减数分裂期高温对水稻幼穗内源游离多胺含量的影响

植物多胺依据存在的形式可分为游离多胺、可溶性结合型多胺和非溶性结合型多胺3种。根据已有的研究，水稻中多胺主要为游离多胺(占多胺总量的80%以上)，结合型多胺含量很低(Sen等1981)。因此，本研究主要测定游离多胺。

由图2可见，减数分裂期高温处理后，耐热品种‘黄华占’幼穗中游离腐胺和亚精胺含量增加，而热敏感品种‘双桂1号’含量减少；游离精胺的含量在两品种中均增加，但‘黄华占’增加量高于‘双桂1号’ (图2-A~C)。比较两品种在高温下的(Spd+Spm)/Put值，发现‘黄华占’品种大于‘双桂1号’ (图2-D)，表明

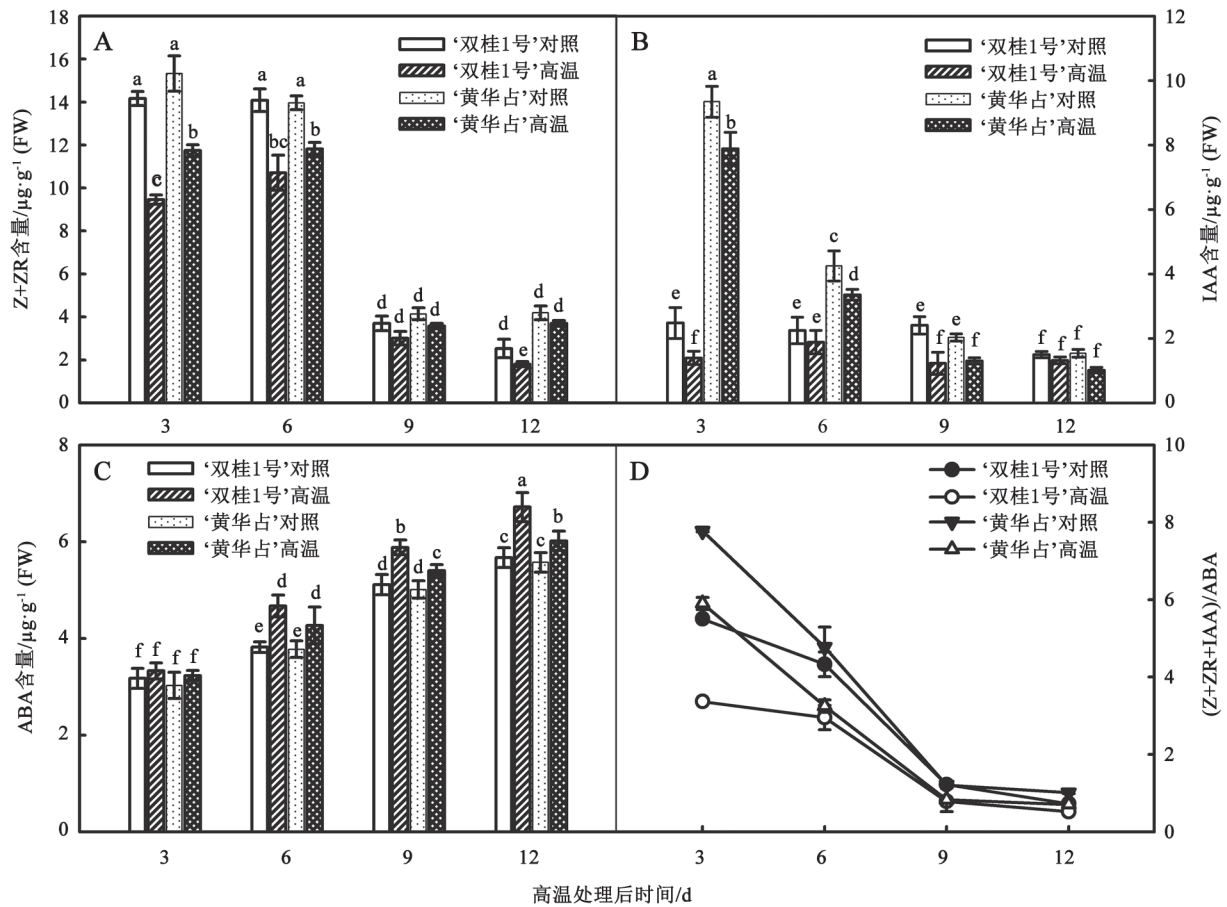


图1 减数分裂期高温对水稻幼穗中Z+ZR (A)、IAA (B)、ABA (C)含量和(Z+ZR+IAA)/ABA (D)的影响  
Fig.1 Effect of high temperature on the levels of Z+ZR (A), IAA (B), ABA (C) and (Z+ZR+IAA)/ABA (D) in spikelets of rice during meiosis

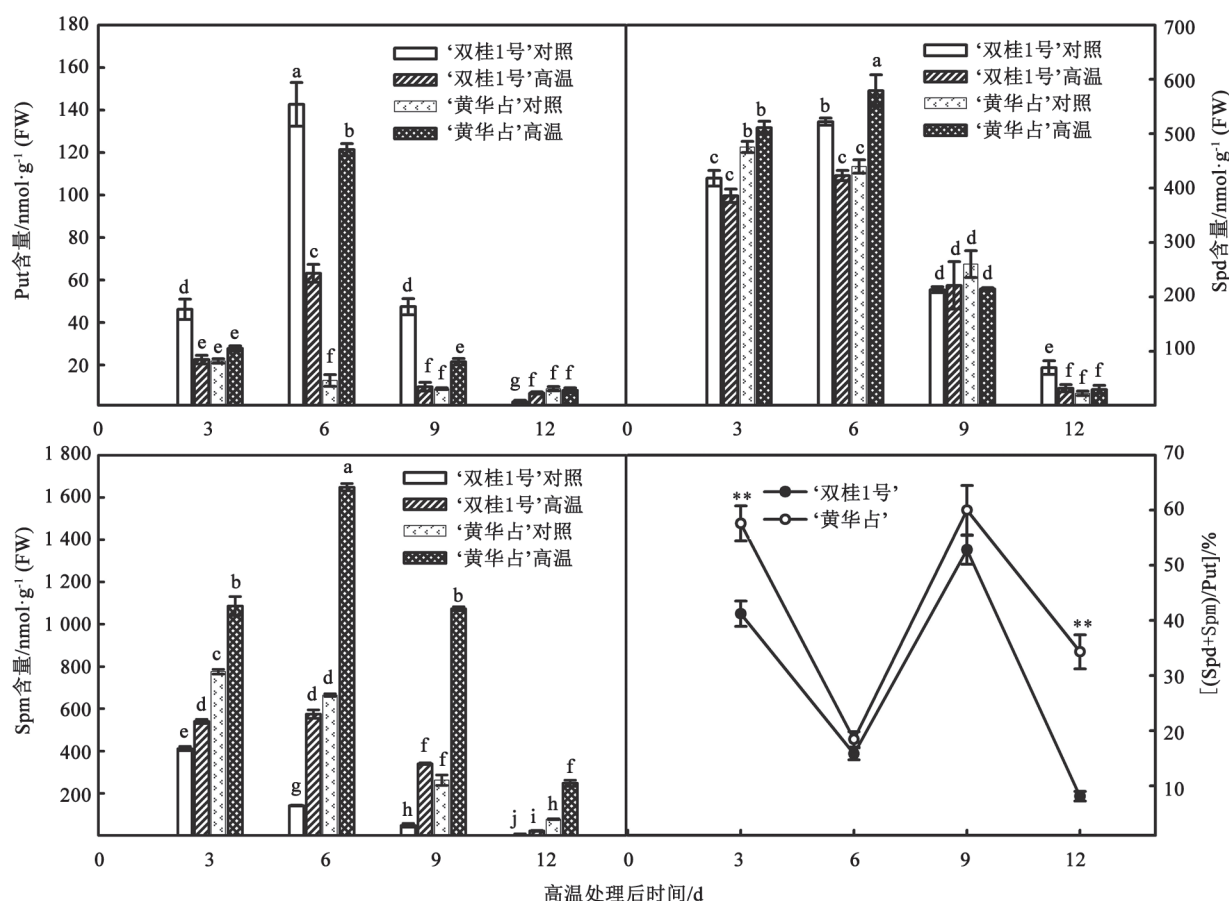


图2 减数分裂期高温对水稻幼穗中游离腐胺Put (A)、Spd (B)、Spm (C)含量和(Spd+Spm)/Put (D)的影响  
Fig.2 Effect of high temperature on the levels of free Put (A), Spd (B), Spm (C) and (Spd+Spm)/Put (D)  
in spikelets of rice during meiosis

减数分裂期受高温胁迫, 与热敏感品种相比, 耐热品种(Spd+Spm)/Put含量相对较高, 从而有利于幼穗抵抗高温逆境。

#### 4 减数分裂期高温下水稻幼穗蛋白质组学分析

##### 4.1 减数分裂期高温对水稻幼穗蛋白质表达的影响

用PD Quest软件对减数分裂期高温处理前后幼穗的双向电泳(2-DE)图谱进行分析, 获得差异蛋白17个(图3)。比较减数分裂期高温对两个水稻品种幼穗蛋白质表达量的影响, 发现品种之间有相似性, 即高温处理后均有蛋白质表达量增加或降低的情况。但‘双桂1号’幼穗中蛋白质表达上调或下调的点数明显多于‘黄华占’, ‘双桂1号’为7个(点3、6~10和12)或5个蛋白点(点1、2、4、5和11), 而‘黄华占’仅为4个(点6、15~17)或2个蛋白点(点13和14)。

##### 4.2 减数分裂期高温下水稻幼穗蛋白质组学分析

对差异蛋白点挖胶后进行胶内酶解。质谱鉴定后每个蛋白质均有相应的指纹图谱, MASCOT搜索后发现有3个蛋白(点3、7和9)无配对, 4个蛋白(点1、2、8和10)无显著的蛋白配对, 其余10个点均有相应的蛋白(表2、图4)。根据MapMan Bin系统(<http://ppdb.tc.cornell.edu/dbsearch/mapman.aspx>)把差异蛋白分成5个功能分类:

(1)氧化还原调控相关蛋白: 包括单脱氢抗坏血酸还原酶(蛋白点15)、硫氧还蛋白还原酶(蛋白点16)和锰型超氧化物歧化酶(蛋白点17)。与常温相比, 高温胁迫下‘黄华占’这三个蛋白质均上调表达。

(2)糖酵解相关蛋白: 包括UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(蛋白点5)、烯醇酶(蛋白点6)和磷酸甘油酸激酶(蛋白点14)。高温胁迫下, 蛋白点5 ‘双桂1号’表

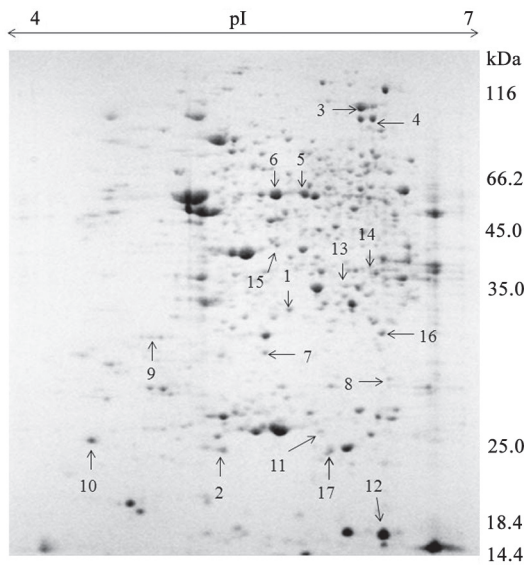


图3 高温胁迫下幼穗蛋白质双向电泳凝胶图谱  
Fig.3 Two-dimensional electrophoresis gel map of protein in spikelets under high temperature

达量下降, 蛋白点6在两品种中均上调表达, 蛋白点14 ‘黄华占’下调表达。

(3)氨基酸代谢相关蛋白: 包括5-甲基四氢叶酸-同型高半胱氨酸甲基转移酶(蛋白点4)、鸟氨酸氨甲酰转移酶(蛋白点13)。高温胁迫下, 蛋白点4仅‘双桂1号’下调表达。蛋白点13仅‘黄华占’下调表达。

(4)胁迫相关蛋白: 反转录转座子蛋白质(蛋白点12)。高温下‘双桂1号’该蛋白的表达量明显增加。

(5)光系统相关蛋白: 光系统II (PSII) 23 kDa多肽(蛋白点11)。高温下‘双桂1号’中该蛋白表达量明显下降。

在这些功能分类中, 糖酵解和氧化还原调控这两类最多, 均占到差异蛋白的30%; 其次是氨基酸代谢, 占到20%; 最后是胁迫和光系统, 二者均为10% (图5)。

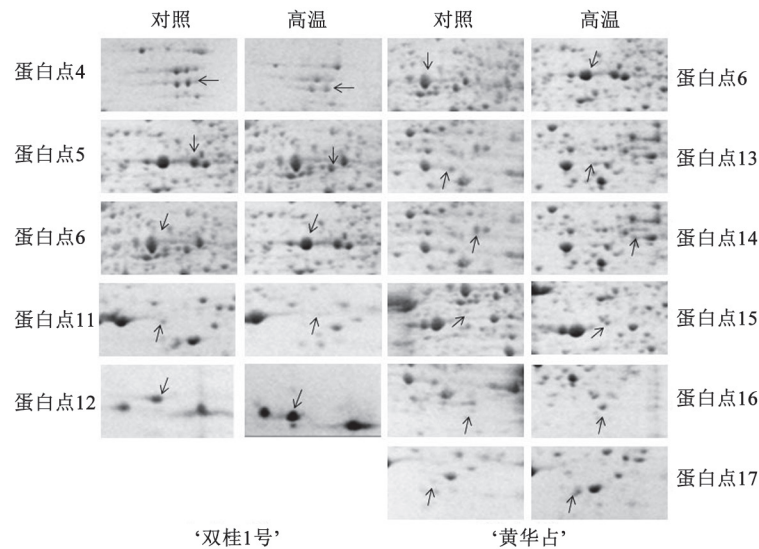


图4 两品种幼穗中质谱鉴定成功的差异蛋白质的表达情况  
Fig.4 The expression of differential proteins successfully identified by mass spectrum in spikelets of two cultivars

### 5 差异蛋白质转录水平的定量分析

为了检验差异蛋白的转录水平, 我们选取了4个差异蛋白, 分别为在‘黄华占’中上调的蛋白点17 (*Os05g25850*)、在‘双桂1号’中下调的蛋白点5 (*Os09g38030*)和蛋白点11 (*Os07g04840*)及在‘黄华占’中下调的蛋白点13 (*Os02g47590*), 对其进行了荧光定量分析。结果如图6所示, 4个基因的表

达水平和双向电泳方法获得的蛋白质表达水平一致。

## 讨 论

减数分裂期高温对水稻受精结实有明显的影 响(曹云英等2008)。而发育良好的幼穗是水稻正常受精的前提条件。有研究表明在逆境下水稻幼

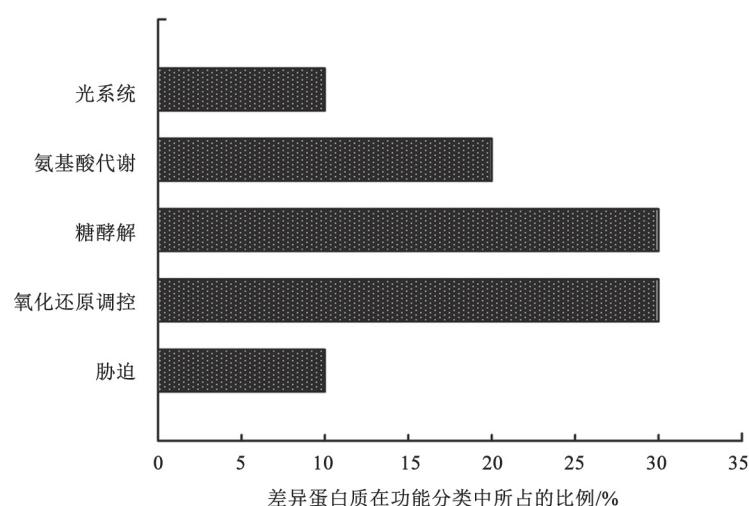


图5 差异蛋白质在不同功能分类中的分布

Fig.5 Distribution of differential proteins in functional categories

表2 减数分裂期高温引起的水稻幼穗中的差异蛋白质的质谱鉴定及功能分类

Table 2 Mass spectrometry identification and function classification of differential proteins in spikelets of rice under high temperature during meiosis

类别	编号	Locus名	标准注释	MapMan bin编号	定位预测	得分
氧化还原调控	15	LOC_Os09g39380	单脱氢抗坏血酸还原酶	21.2	线粒体	377
	16	LOC_Os02g48290	硫氧还蛋白还原酶	21.1	线粒体	235
糖酵解	17	LOC_Os05g25850	锰型超氧化物歧化酶	21.6	线粒体、细胞质	65
	5	LOC_Os09g38030	UDP-葡萄糖焦磷酸化酶	4.1	细胞质	115
	6	LOC_Os10g08550	烯醇酶	4.12	叶绿体、细胞质	417
氨基酸代谢	14	LOC_Os06g45710	磷酸甘油酸激酶	4.10	细胞质	116
	4	LOC_Os12g42884	5-甲基四氢叶酸-同型高半胱氨酸甲基转移酶	13.1.3.4	细胞质	230
胁迫	13	LOC_Os02g47590	鸟氨酸氨甲酰转移酶	13.1.2.3.21	叶绿体	117
	12	LOC_Os08g03520	假定的反转录转座子蛋白质Ty1-copia类	20.2.2	细胞质	287
光系统	11	LOC_Os07g04840	光系统II 23 kDa 多肽I	1.1.1.2	叶绿体	184

Locus名: 基因位点名; MapMan bin编号: MapMan软件分析基因所属功能的编号。

穗体内物质会发生变化(Dooki等2006), 但这些物质的变化与受精结实之间的联系尚不清楚。本研究主要从幼穗的内源激素、多胺和蛋白质组学等方面分析不同耐热性水稻品种受精结实率差异的形成原因。

### 1 内源激素与水稻受精结实的关系

有研究报道, 水稻受精率下降与花粉发育异常有关(Matsui和Omasa 2002; 石春林等2008), 而激素在花粉发育方面起着重要的作用, 过量的ABA和低水平的IAA及细胞分裂素可能会导致育性下降或花粉不育(Ahokas 1982; Oliver等2007; Toh等

2008; Tang等2008; Sakata等2010)。本研究的结果与之相同, 但还发现高温使耐热品种的变化小于热敏感品种。相关分析表明受精率与幼穗中的IAA和(Z+ZR)含量成正相关, 与ABA则成负相关。推测高温下耐热品种幼穗中保持较高的IAA和(Z+ZR)和较低的ABA水平有利于花粉发育, 以及获得相对较高的受精率。

### 2 内源多胺与水稻受精结实的关系

植株体内游离多胺水平、多胺合成关键酶活性与生殖器官的发育密切相关, 并最终影响受精结实。SAMDC是多胺合成的关键酶, 有研究表明

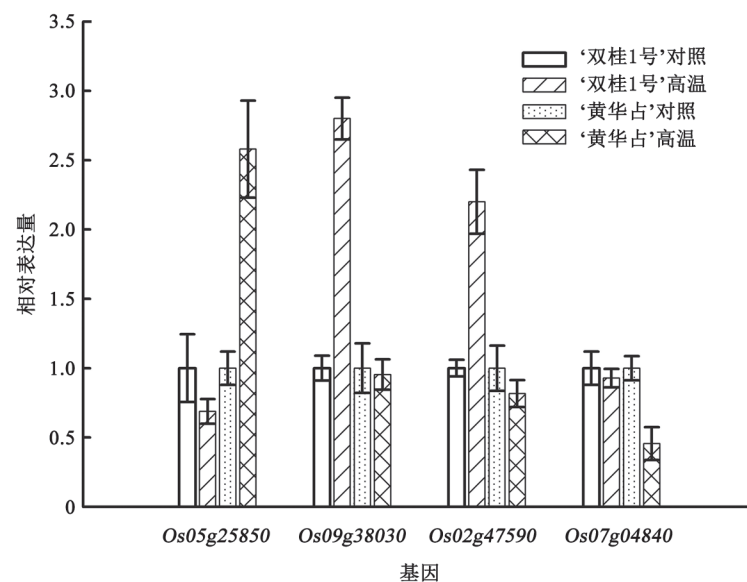


图6 差异蛋白质转录水平在两品种幼穗中的表达

Fig.6 Gene expression of differential proteins in spikelets of two cultivars

在可育的花药中显示SAMDC活性, 在不育的花药中则没有(Falasca等2010); 表达下调的转*Os SAM-DC2*基因水稻中Spd和Spm水平减少, 伴随着花粉活力和结实率均下降(Chen等2014)。外源Put能增强环境胁迫植物的耐盐能力, 改善花粉的育性, 从而提高结实率(Ndayiragije和Lutts 2007)。本研究表明高温下水稻幼穗中多胺含量发生了变化, 但不同种类及品种的游离多胺的变化存在差异。相关分析发现受精率与Spm相关不显著, 而与Put和Spd含量显著相关, 推测精胺在幼穗发育中的作用相对较小, 腐胺和亚精胺含量的减少可能是造成热敏感品种受精结实明显下降的主要原因。

### 3 蛋白质与水稻受精结实的关系

本研究观察到, 减数分裂期高温处理使两品种中蛋白质表达量明显不同, 蛋白质的功能也分几类。根据差异蛋白质功能分析, 推测高温胁迫下两品种受精结实差异在蛋白质方面可能有以下原因:

(1)氧化还原调控和胁迫相关蛋白表达的差异。本研究中鉴定的单脱氢抗坏血酸还原酶、硫氧还蛋白还原酶(TDR)、锰型超氧化物歧化酶都与植物体内氧化还原调控密切相关。单脱氢抗坏血酸还原酶能还原单脱氢抗坏血酸再生出抗坏血酸; 硫氧还蛋白还原酶能将硫氧还蛋白(Trx)还原,

形成TDR-Trx系统, 可使脱氢抗坏血酸还原形成抗坏血酸(瞿祥虎等1999)。锰超氧化物歧化酶是超氧化物歧化酶(SOD)的一种, 能够催化超氧阴离子自由基歧化为过氧化氢与氧气, 专一清除体内活性氧和自由基(任洪林等2009)。这3种酶在植物抗氧化逆境中发挥着重要作用。在本研究中, 与常温相比, 这3种酶的表达量在耐热品种中均显著上调(图4), 在热敏感品种中不变化甚至有所下降(图6)。说明耐热品种在高温下水稻植株体清除活性氧自由基的能力增强, 有效地进行了自我调节和保护, 因而受精结实率高。

反转录转座子蛋白质是一种与胁迫相关的蛋白。在多个物种中都能观察到反转录转座子的激活(Grandbastien 1998)。如Woodrow等(2010)在盐和光胁迫下硬质小麦中发现了一种新型Ty1-copia的反转录转座子。本研究中'双桂1号'高温条件下幼穗中也发现了一种反转录转座子蛋白质的上调表达, 这可能是其适应高温胁迫的一种保护机制。

(2)糖酵解和光系统相关蛋白表达的差异。本研究中鉴定的UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UGPase)、烯醇酶和磷酸甘油酸激酶(PGK)均为糖酵解途径的关键酶。水稻中UGPase的两个同源基因*Os Ugp1*和*Os Ugp2*在花粉母细胞减数分裂期胼胝质的沉积及花粉成熟过程中起关键作用(Mu等



2009)。磷酸甘油酸激酶是光合碳同化产物甘油醛-3-磷酸(GAP)形成所需要的一种催化剂。烯醇酶催化磷酸甘油酸脱水形成磷酸烯醇式丙酮酸,在胁迫条件下其表达量及酶活性都会发生相应的变化(Forsthoefel等1995;朱晓军等2004)。如Mostek等(2015)在盐胁迫中发现与糖酵解相关的酶在耐热大麦品种中有上调的趋势;在热敏感品种中有下调的趋势。本研究发现烯醇酶在两品种中均上调表达,热敏感品种UGPase和耐热品种PGK下调表达,这些酶丰度的变化与盐胁迫大麦中不太一致,可能是由胁迫种类和程度不同导致。本研究中高湿胁迫使这些酶的活性发生变化,导致蛋白表达水平上升或下降(图4),光合作用及糖酵解途径可能受阻亦或能量代谢发生变化,导致花粉中积累的淀粉偏少,这可能是两品种的受精结实率都有下降的原因。

PSII 23 kDa多肽I是结合于PSII上的蛋白质,与光氧化水释放氧的过程中Ca<sup>2+</sup>和Cl<sup>-</sup>的结合相关,起着维持放氧活性的作用(Hankamer和Barber 1997)。周伟辉(2011)发现抽穗开花期高温胁迫导致PSII 23 kDa蛋白表达量的下降。本研究中也发现减数分裂期高温使热敏感品种中该蛋白表达下调,说明高温可能影响其放氧复合体的结构和功能,最终影响放氧效率和光合电子传递。

(3)氨基酸代谢相关蛋白表达的差异。本研究中鉴定的与氨基酸代谢相关蛋白有5-甲基四氢叶酸-同型高半胱氨酸甲基转移酶和鸟氨酸氨甲酰转移酶。5-甲基四氢叶酸-同型高半胱氨酸甲基转移酶简称甲硫氨酸合成酶还原酶,是植物体内参与甲硫氨酸合成的重要酶类,而甲硫氨酸是蛋白质合成的必需氨基酸。鸟氨酸氨甲酰转移酶是植物瓜氨酸合成的关键酶。瓜氨酸是一种非蛋白氨基酸,在清除氧自由基方面的效率非常高。本研究发现‘双桂1号’中5-甲基四氢叶酸-同型高半胱氨酸甲基转移酶和‘黄华占’中鸟氨酸氨甲酰转移酶表达下调。说明高温胁迫均影响两品种的氨基酸代谢,但在热敏感品种影响参与蛋白质合成和碳代谢的必需氨基酸代谢,这些是细胞生长的基础性物质;而在耐热品种影响与氧自由基清除相关的非蛋白氨基酸代谢,因而对两者最终受精结实造成不同程度的影响。

花粉母细胞减数分裂期是水稻对逆境胁迫的敏感时期。此时遭遇高温胁迫会使水稻受精不良,结实率降低,进而影响产量,但耐热性水稻受高温影响较小。高温增加了两水稻品种幼穗中的ABA含量,减少了IAA、Z+ZR含量,热敏感品种变化大于耐热品种;高温增加了两品种幼穗中游离Spm含量,增加了耐热品种中游离Put和Spd含量,而热敏感品种相反。通过蛋白组学比较两品种幼穗中蛋白质表达情况,表明差异蛋白主要涉及氧化还原调控、氨基酸代谢、糖酵解、胁迫响应和光系统。其中氧化还原调控相关蛋白主要在耐热品种中高表达。耐热品种在高温下受精结实较好与其幼穗中较高的IAA、Z+ZR和游离多胺含量,较低的ABA含量及高表达的氧化还原调控相关的蛋白有密切关系。

### 参考文献

- 曹云英,段骅,杨立年,王志琴,刘立军,杨建昌(2009). 抽穗和灌浆早期高温对耐热性不同籼稻品种产量的影响及其生理原因. 作物学报, 35 (3): 512~521
- 曹云英,段骅,杨立年,王志琴,周少川,杨建昌(2008). 减数分裂期高温胁迫对耐热性不同水稻品种产量的影响及其生理原因. 作物学报, 34 (12): 2134~2142
- 陈远平,杨文钰(2005). 卵叶韭休眠芽中GA<sub>3</sub>、IAA、ABA和ZT的高效液相色谱法测定. 四川农业大学学报, 23 (4): 498~500
- 丁颖(1961). 中国水稻栽培学. 北京: 中国农业出版社, 160~165
- 广东省农科院水稻所水稻遗传综合技术育种研究室(1982). 水稻新良种‘双桂1号’. 广东农业科学, (2): 45, 33
- 瞿祥虎,黄开勋,徐辉碧(1999). 一种新的酶——硫氧还蛋白还原酶. 生命的化学, 19 (2): 54~55
- 任洪林,柳增善,王克坚(2009). 鲍免疫相关基因和蛋白的研究进展. 遗传, 31 (4): 348~358
- 石春林,金之庆,郑建初,汤日圣(2008). 减数分裂期高温对水稻颖花结实率影响的定量分析. 作物学报, 34 (4): 627~631
- 周国峰,陈苏敏,夏光荣,郑春山(2011). 优质中晚稻新品种黄华占特征特性及高产栽培技术. 吉林农业, (3): 137
- 周伟辉,薛大伟,张国平(2011). 高温胁迫下水稻叶片的蛋白响应及其基因型和生育期差异. 作物学报, 37 (5): 820~831
- 朱晓军,杨劲松,梁永超,娄运生,杨晓英(2004). 盐胁迫下钙对水稻幼苗光合作用及相关生理特性的影响. 中国农业科学, 37 (10): 1497~1503
- Ahokas H (1982). Cytoplasmic male sterility in barley: Evidence for the involvement of cytokinins in fertility restoration. Proc Natl Acad Sci USA, 79: 7605~7608
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Chen M, Chen J, Fang J, Guo Z, Lu S (2014). Down-regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase genes results in reduced

- plant length, pollen viability, and abiotic stress tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 116: 311~322
- DiTomaso JM, Shaff JE, Kochian LV (1989). Putrescine-induced wounding and its effects on membrane integrity and ion transport processes in roots of intact corn seedlings. *Plant Physiol*, 90: 988~995
- Dooki AD, Mayer-Posner FJ, Askari H, Zaiee AA, Salekdeh GH (2006). Proteomic responses of rice young panicles to salinity. *Proteomics*, 6: 6498~6507
- Falasca G, Franceschetti M, Bagni N, Altamura MM, Biasi R (2010). Polyamine biosynthesis and control of the development of functional pollen in kiwifruit. *Plant Physiol Biochem*, 48: 565~573
- Flores HE, Galston AW (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol*, 69: 701~706
- Forsthoefel NR, Cushman MAF, Cushman JC (1995). Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol*, 108: 1185~1195
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W (1999). Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, 20: 712~717
- Grandbastien MA (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci*, 3 (5): 181~187
- Hankamer B, Barber J (1997). Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 641~671
- Hayase H, Satake T, Nishiyama I, Ito N (1969). Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants. II. The most sensitive stage to cooling and the fertilizing ability of pistils. *Jpn J Crop Sci*, 38: 706~711
- Jagadish SVK, Muthurajan R, Oane R, Wheeler TR, Heuer S, Bennett J, Craufurd PQ (2010). Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 61 (1): 143~156
- Jain M, Chourey PS, Boote KJ, Allen Jr LH (2010). Short-term high temperature growth conditions during vegetative-to-reproductive phase transition irreversibly compromise cell wall invertase-mediated sucrose catalysis and microspore meiosis in grains sorghum (*Sorghum bicolor*). *J Plant Physiol*, 167: 578~582
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228: 367~381
- Matsui T, Omasa K (2002). Rice (*Oryza sativa* L.) cultivars tolerant to high temperature at flowering: Anther characteristics. *Ann Bot*, 89: 683~687
- Mostek A, Börner A, Badowiec A, Weidner S (2015). Alterations in root proteome of salt-sensitive and tolerant barley lines under salt stress conditions. *J Plant Physiol*, 174: 166~176
- Mu H, Ke JH, Liu W, Zhuang CX, Yip WK (2009). UDP-glucose pyrophosphorylase2 (*OsUgp2*), a pollen-preferential gene in rice, plays a critical role in starch accumulation during pollen maturation. *Chin Sci Bull*, 54 (2): 234~243
- Ndayiragije A, Lutts S (2007). Long term exogenous putrescine application improves grain yield of a salt-sensitive rice cultivar exposed to NaCl. *Plant Soil*, 291: 225~238
- Oliver SN, Dennis ES, Dolferus R (2007). ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant Cell Physiol*, 48 (9): 1319~1330
- Rang ZW, Jagadish SVK, Zhou QM, Craufurd PQ, Heuer S (2011). Effect of high temperature and water stress on pollen germination and spikelet fertility in rice. *Environ Exp Bot*, 70: 58~65
- Sakata T, Oshino T, Miura S, Tomabeche M, Tsunaga Y, Higashitani N, Miyazawa Y, Takahashi H, Watanabe M, Higashitani A (2010). Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (19): 8569~8574
- Sen K, Choudhuri MM, Ghosh B (1981). Changes in polyamine contents during development and germination of rice seeds. *Phytochemistry*, 20 (4): 631~633
- Song J, Nada K, Tachibana S (2002). Suppression of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is a major cause for high-temperature inhibition of pollen germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Physiol*, 43: 619~627
- Tang RS, Zheng JC, Jin ZQ, Zhang DD, Huang YH, Chen LG (2008). Possible correlation between high temperature-induced floret sterility and endogenous levels of IAA, GAs and ABA in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regul*, 54: 37~43
- Toh S, Imamura A, Watanabe A, Nakabayashi K, Okamoto M, Jikumaru Y, Hanada A, Aso Y, Ishiyama K, Tamura N et al (2008). High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. *Plant Physiol*, 146: 1368~1385
- Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S, Cresti M (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24: 2369~2375.
- Woodrow P, Pontecorvo G, Fantaccione S, Fuggi A, Kafantaris I, Parisi D, Carillo P (2010). Polymorphism of a new Ty1-*copia* retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses. *Theor Appl Genet*, 121: 311~322
- Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF (2010). Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *J Exp Bot*, 61 (7): 1959~1968