

水稻红莲型细胞质雄性不育幼穗发育过程中组织型转谷氨酰胺酶活性比较

常 逊¹ 张再君^{1,2,*} 李阳生^{1,*} 朱英国¹

(¹ 武汉大学 生命科学学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072 ; ² 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025 ; * 通讯联系人, E-mail : lysh21cn@163.com ; zjzhang0459@yahoo.com.cn)

Comparison of Tissue Transglutaminase Activity During Young Panicle Development in Honglian Type Cytoplasmic Male Sterile Rice (*Oryza sativa*)

CHANG Xun¹ , ZHANG Zaijun^{1,2,*} , LI Yangsheng^{1,*} , ZHU Yingguo¹

(¹ Key Laboratory of the Education Ministry of China for Developmental Biology , College of Life Sciences , Wuhan University , Wuhan 430072 , China ; ² Agricultural College , Yangtze University , Jingzhou 434025 , China ; * Corresponding author , E mail : lysh21cn@163.com ; zjzhang0459@yahoo.com.cn)

Abstract : The leaves and young panicles at different developmental stages , being excised from the Honglian type cytoplasmic male sterile line , Yuetai A and its maintainer line , Yuetai B , were used to investigate the changes of tissue transglutaminase activity . An ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) measurement protocol for tissue transglutaminase activity detection in rice was well established . It was found that tissue transglutaminase activity was regulated positively by calcium cation , and in Yuetai A and Yuetai B the tissue transglutaminase activity in the senescent leaves was remarkably higher than that in the young leaves , but there was no distinct difference between Yuetai A and Yuetai B . Interestingly , from the tetrad to binucleate stages the tissue transglutaminase activity increased gradually with the development of the young panicles and up to maximum at binucleate stage in Yuetai A . However , no similar changes were observed in Yuetai B . It was suggested that tissue transglutaminase was involved in programmed cell death in abortive pollen .

Key words : rice ; cytoplasmic male sterility ; young panicle development ; tissue transglutaminase ; programmed cell death

摘 要 : 以水稻红莲型细胞质雄性不育系粤泰 A 和保持系粤泰 B 的叶片和不同发育时期幼穗为材料 , 比较分析了水稻红莲型细胞质雄性不育幼穗发育过程中组织型转谷氨酰胺 (tTG) 酶活性变化 , 建立了适合水稻 tTG 酶活性分析的酶联免疫法 (ELISA) 测定反应体系。研究发现 tTG 酶活性受钙离子正调控 , 并且无论是粤泰 A 还是粤泰 B , 衰老叶片中 tTG 酶活性都高于新叶片 , 但粤泰 A 与粤泰 B 之间的差异不明显 ; 不育系粤泰 A 自四分体到二核期的幼穗不同发育阶段 , tTG 酶活性随着花粉发育而增强 , 在二核期达到最高 , 而在保持系粤泰 B 中 , tTG 酶活性没有随发育进程发生显著变化。推断 tTG 酶与花粉败育过程中的细胞程序性死亡有关。

关键词 : 水稻 ; 细胞质雄性不育 ; 幼穗发育 ; 组织型转谷氨酰胺酶 ; 细胞程序性死亡

中图分类号 : Q945 . 6S ; S311 ; S511 . 01

文献标识码 : A

文章编号 : 1001-7216(2006)02-0183-06

水稻是我国最主要的粮食作物 , 杂交水稻的发展为我国粮食增产发挥了重要作用。水稻杂种优势利用的基础是细胞质雄性不育系统的发掘和利用 , 虽然我国水稻杂种优势利用一直保持世界领先水平 , 但是关于水稻雄性不育及其育性恢复的机理研究还相对滞后 , 仍有许多问题值得深入探索。

近几年有文献报道植物雄性不育与细胞凋亡现象存在联系 , 并提出了分子方面的证据。Balk 和 Leaver^[1] 发现在向日葵细胞质雄性不育类型 PET1-CMS 里的线粒体基因组突变使得细胞色素 C 释放 , 最终导致绒毡层细胞凋亡。Ku 等^[2] 证实了温敏雄性不育水稻中绒毡层的早期凋亡与雄性不育的联系。Li 等^[3] 对红莲型细胞质雄性不育系粤泰 A、保持系粤泰 B 不同发育时期的花药组织的

DNA 断裂现象进行 TUNEL 检测 , 发现在造孢细胞分裂期和小孢子母细胞时期 , 不育系粤泰 A 和保持系粤泰 B 之间未见差异 ; 而当小孢子母细胞发育到减数分裂期 , 粤泰 A、B 中的结果明显不同 , 粤泰 A 中出现明显细胞核 DNA 断裂现象 ; 电泳检测发现 , 自四分体时期开始 , 在粤泰 A 中出现细胞核 DNA 片段化 , 单核早期则可见明显的 DNA ladder 现象 , 粤泰 B 则没有观察到类似的现象。

通常 , 转谷氨酰胺酶 (TGase) 家族包括角化细

收稿日期 : 2005-07-26 ; 修改稿收到日期 : 2005-12-27。

基金项目 : 国家 973 计划资助项目 (2001CB108806) ; 创新研究群体科学基金资助项目 (C01020305) ; 长江学者和创新团队发展计划资助项目。

第一作者简介 : 常 逊 (1980 -) , 男 , 硕士研究生。

胞转谷氨酰胺酶 (TG_k, type)、组织型转谷氨酰胺酶 (TG_c, type)、表皮细胞转谷氨酰胺酶 (TG_E) 和凝血因子 a, 是一类通常以依赖于 Ca²⁺ 的形式来催化蛋白质谷氨酰胺残基与赖氨酸残基交联活性的酶^[4]。转谷氨酰胺酶能通过转氨反应来催化翻译后蛋白质的修饰, 转氨作用能够造成^[5]: 1) 通过催化一个蛋白的去质子化的赖氨酸 (Lys) 残基供体和另一个蛋白的谷氨酰胺残基受体之间形成 N (- glutamyl)lysine 异肽键, 使蛋白质交联; 2) 一个氨基酸 (H₂NR) 通过谷氨酰胺残基与受体蛋白结合起来 (双胺或多胺可以在两个受体分子之间形成双谷氨酰胺加合物); 3) 蛋白质赖氨酸 (Lys) 一边链的酰基化; 4) 酯化反应; 5) 去氨基作用; 6) 异肽键的切除。反应 2) 和 3) 竞争抑制 1) 中蛋白质的交联。转谷氨酰胺酶只在一些蛋白质和肽键的 - 氨基和特定的内源谷氨酰胺残基之间起作用。转谷氨酰胺酶能够特异识别它的赖氨酸和谷氨酰胺供体。转氨作用的进行可能会引起能量的微弱变化。如果不是发生相位变化 (凝固、沉淀), 这种反应是可逆的。4) 中的酯化作用也是如此, 但是 5) 中的去氨基作用和 6) 中的异肽键切除则不可逆。

转谷氨酰胺酶家族中的组织型转谷氨酰胺酶具有结合和水解 GTP/ATP 的功能, 在信号转导过程中发挥作用^[4]。现在已经知道, 组织型转谷氨酰胺酶 (tissue transglutaminase, tTG) 的活性变化是细胞凋亡中的重要生化特征之一。研究表明, 在细胞凋亡过程中 tTG 酶表达水平都有明显的升高, tTG 酶的高表达能增强细胞对凋亡的敏感性, 它的表达升高可作为细胞凋亡的标志之一^[4]。tTG 酶具有相对独立的催化蛋白质交联和结合并水解 GTP/ATP 活性。首先, tTG 酶能通过催化蛋白质谷氨酰胺残基或多胺与赖氨酸残基间的转谷氨酰胺反应使蛋白质分子发生交联。Cys²⁷⁷、His³³⁵、Asp³⁵⁸ 残基构成了 Ca²⁺ 依赖的转谷氨酰胺活性中心。形成的异肽键对蛋白水解作用很稳定, 增加了组织对物理和化学作用的抵抗力, 其次 tTG 还能与 GTP 或 ATP 以 1 : 1 比例结合并水解 GTP 或 ATP。

tTG 酶的研究主要是在动物中, Graham 等^[6]对豌豆、蚕豆、小麦、大麦等材料的研究表明 tTG 酶在单子叶植物和双子叶植物中也广泛存在。雄性不育发育过程中细胞凋亡现象有关分子生物学的研究在本文之前已有报道。为了进一步寻找雄性不育发育过程中细胞凋亡生理生化方面的证据, 深入研究雄性不育的机理, 本研究以 tTG 酶活性为检测对

象, 比较了雄性不育水稻材料不育系与保持系不同发育时期及不同组织的 tTG 酶活性, 探讨 tTG 酶与红莲型水稻花粉败育之间的关系, 为证实水稻雄性不育是一种细胞凋亡现象提供了一定的生理学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

红莲型细胞质雄性不育系粤泰 A, 相应保持系粤泰 B 的种子由武汉大学遗传研究所繁育、提供。

1.2 试剂与器材

酶标仪购自吉泰生物科技有限公司。

纯化 tTG 酶、N, N' - Dimethylcasein、N (5' aminopentyl) biotinamide、Streptavidin HRPO-conjugated 及其底物四甲基联苯胺 (Tetramethylbenzidine, TMB) 均来自于 Sigma 公司; DTT、BSA 及 96 孔酶标板均购自武汉市凌飞公司; 其余常用试剂均为分析纯。

1.3 材料种植处理

取粤泰 A, 粤泰 B 健康成熟的种子用 0.1% 升汞消毒 10 min, 蒸馏水清洗 3 次, 每次 3 min, 37℃ 下浸泡 24 ~ 48 h, 待种子破胸再将其铺在装有蛭石的培养皿里, 温室条件下 (温度为 30℃ 恒温, 光照强度为 2600 lx) 生长至 5 叶期取叶片备用。

取粤泰 A、粤泰 B 干净、无损伤的已抽穗植株的衰老叶片, 蒸馏水洗后, 晾干备用。粤泰 A、粤泰 B 的穗子按照时期分为四分体 (包括减数分裂期)、单核 (包括单核早期和单核晚期) 与二核期, 穗子上枝梗部分须清除。

1.4 试验方法

1.4.1 tTG 酶蛋白提取^[6]

取材料 30 g 左右, 在液氮中磨碎, 按照 1 : 1.5 ~ 2.5 (W_{材料} : V_{溶液}) 的比例加入预冷 (4℃) 的 50 mmol/L Tris HCl (pH 7.4), 包含 250 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L EDTA、10 mmol/L 巯基乙醇、1 mmol/L PMSF、5% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 混合物在一起搅拌, 至聚乙烯吡咯烷酮完全溶解后, 用两层纱布过滤, 用固体 Tris 调节 pH 至 7.4, 于 13 000 × g, 4℃ 下离心 20 min, 取上清, 再于 80 000 × g, 4℃ 下离心 45 min, 上清蛋白加入固体 (NH₄)₂SO₄ 至 90% 饱和度来沉淀, 沉淀于 13 000 × g, 4℃ 下离心 20 min, 重悬入大体积 (V_{缓冲液} : V_{样品} 大于 100 : 1) 的 50 mmol/L Tris HCl (pH 7.4), 含 1 mmol/L 巯基乙醇的缓冲液中透析。整个操作在

低温条件下进行,避免污染。

1.4.2 tTG 酶活力的测定^[7]

1.4.2.1 酶活力测定优化反应体系的建立。设置不同浓度范围的初步纯化 tTG(0.50~2.75, 5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和钙离子 Ca^{2+} (0.1~5.0 mmol/L),并且尝试不同的反应时间,来确定反应体系中反应物的最佳浓度和最适反应时间。

1.4.2.2 蛋白质浓度的测定。采用考马斯亮蓝染色法,每次活力测定前测定蛋白质浓度,以便统一测量标准,本实验样品蛋白含量为 50 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 。

1.4.2.3 tTG 酶活性测定^[8]。TBST 溶液: 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8)+150 mmol/L NaCl +体积分数为 0.001%的 Tween 20。

每个孔加入 200 μL (10~20 mg/mL 溶于 PBS) N,N'-Dimethylcasein 来包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 1 h。包被结束后每个孔加入 200 μL PBS(含 2%脱脂奶)封闭自由的蛋白结合位点,37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 1 h。过后用 PBS 洗 3 次(处理的板可以在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 4 个月)。

每个孔里加入提取蛋白(50~100 μg)或是纯化的 tTG(1~10 μg),DTT 5 mmol/L(在混合前先加),Tris-HCl 0.1 mmol/L (pH 8),NaCl 0.15 mol/L,不同浓度的 CaCl_2 ,N-(5' aminopentyl) biotinamide 0.5 mmol/L。准备好对照,对照孔中不含样品蛋白, Ca^{2+} 零浓度由加入 5 mmol/L EGTA 达到,37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 1 h。

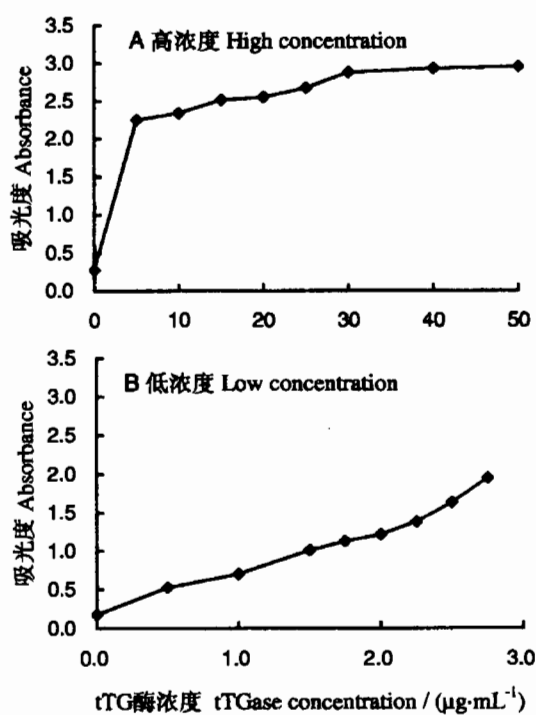


图1 高浓度和低浓度纯化 tTG 酶的反应曲线

Fig. 1. Reaction curve of purified tissue transglutaminase at high and low concentrations.

用 TBST 溶液洗板 3 次。TBST 溶液中加入 2%脱脂奶粉,稀释 Streptavidin HRPO-conjugated, 最终浓度为 1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,室温下放置 1 h,再用 TBST 溶液洗板 5 次,加入 50%的 TMB 底物 200 μL ,过 30 min 后加入 2 mol/L H_2SO_4 50 μL 终止反应。在酶标仪 450 nm 波长下读数,所有数据均由 3 次重复取平均值所得。酶活性单位定义为每 1 h 时间内 450 nm 波长下吸光度 1 个单位的变化。

2 结果与分析

2.1 酰联免疫(ELISA)反应体系的建立

由于以前检测 tTG 酶的 ELISA 反应体系是以动物为检测对象建立的。本研究中,我们首先通过纯化 tTG 酶的实验来摸索合适的反应条件与其自身规律。ELISA 检测 tTG 酶的反应体系中,酶量的高低是影响检测结果的主要因素之一。为研究反应体系中酶活性变化与钙离子浓度之间的关系,首先须明确反应体系中适合的酶量。图 1-A 中 tTG 酶反应浓度为 5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,图 1-B 中 tTG 酶反应浓度为 0.50~2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$,钙离子浓度为 5 mmol/L。图 1 结果表明,在钙离子浓度为 5 mmol/L,参加反应的酶量在 5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间时,吸光度值增加缓慢,不表现出线性关系(图 1-A);而参加反应的酶量在 0.50~2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间时,吸光度值近似线性增加(图 1-B)。

图 2 所示为不同钙离子浓度(0.1~5.0 mmol/

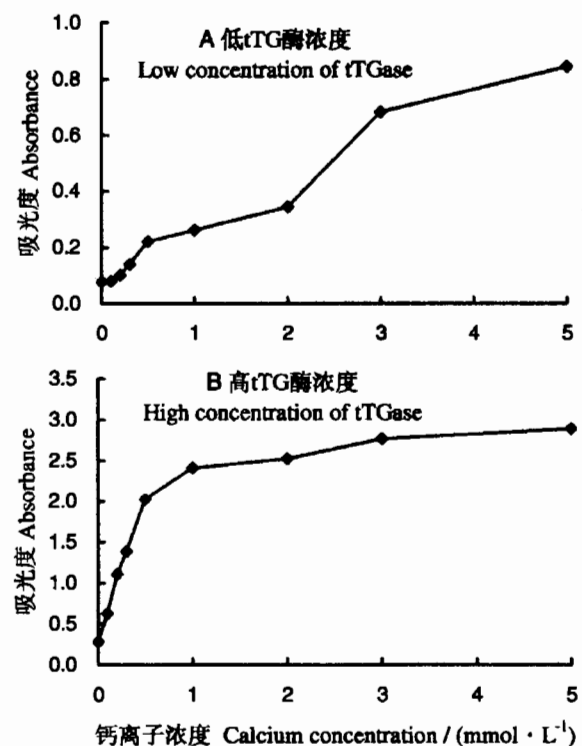


图2 不同钙离子浓度在高、低 tTG 酶浓度时的反应曲线

Fig. 2. Reaction curve of purified tissue transglutaminase at low and high concentrations and calcium cation at different concentrations.

L)下, tTG 酶浓度分别为 $1.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时的反应曲线。图 2-A 中 tTG 酶浓度为 $1.25 \mu\text{g}/\text{mL}$, 图 2-B 中 tTG 酶浓度为 $12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。很明显, tTG 酶浓度为 $1.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 随钙离子浓度的增加, 吸光度值近似线性增加; 而 tTG 酶浓度为 $12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 在低钙浓度 ($0.1 \sim 0.5 \text{ mmol}/\text{L}$) 范围内, 吸光度线性增加; 高钙浓度 ($0.5 \sim 5.0 \text{ mmol}/\text{L}$) 范围内, 吸光度值增加缓慢, 反应趋于饱和。因此, 实验选定的钙离子浓度 ($0.1 \sim 5.0 \text{ mmol}/\text{L}$) 可以覆盖 tTG 酶反应范围。

比较图 1 和图 2 可以发现, tTG 酶和钙离子的反应曲线有相似之处, 在低浓度时基本上随反应物浓度增大而呈正比增长, 在高浓度时增长缓慢, 反应曲线呈饱和状态。但两者又存在明显差异, tTG 酶反应曲线相对陡峭, 很快达到最高点; 而钙离子的反应曲线相对平缓, 缓慢达到最高点。这种差异可能与 tTG 酶和钙离子在反应中作用不同有关。tTG 酶作为直接催化剂, 对浓度比较敏感, 在 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度时就已经接近最高峰; 相对而言, 钙离子则是在 $1 \text{ mmol}/\text{L}$ 左右曲线变平缓。说明较高的钙离子浓度有助于提高 tTG 酶活性, 而这个作用是变化较缓慢的。

本次实验中, 各反应温度的轻微变化对实验结果影响不大, 故所有的反应温度均用 37°C [8]。进行纯化 tTG 酶实验时, 由于反应灵敏, 酶标板很快变色, 短时间内样品吸光度达到上限, 故采用 50%

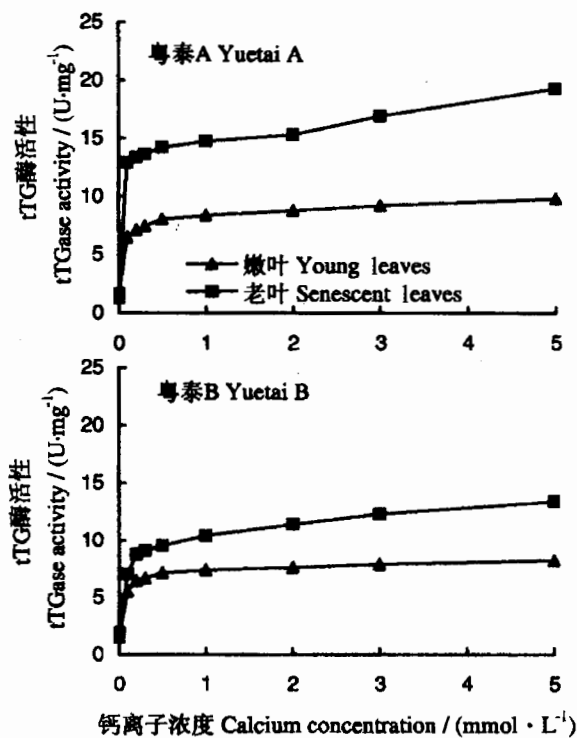


图 3 粤泰 A、粤泰 B 不同时期叶片中 tTG 酶的反应曲线
Fig. 3. Reaction curves of tissue transglutaminase in the leaves of Yuetai A and Yuetai B at different stages.

TMB 底物。实际用植物中提取的蛋白质进行反应时, 也可用 100% TMB 底物。在反应时间上, 一旦加入 TMB 底物, 吸光度便不断变大, 在 30 min 左右停止反应比较合适。时间再长, 吸光度均达最大值, 就很难分辨出变化了。此外, 有很多因素会导致背景色过高, 其中最主要的是不正确的洗涤, 洗涤不充分或省略洗涤步骤中的任何一步均会导致背景色过高, 因此, 实验中洗涤充分非常重要。

以上实验结果验证了 tTG 酶的生化特征: 随钙离子浓度在一定范围内的提高, tTG 酶的活性增强。这一结果也说明, 实验中的试剂及相应反应条件能满足 tTG 酶测试的要求。

2.2 红莲型细胞质雄性不育水稻 tTG 酶活性分析

2.2.1 粤泰 A 与粤泰 B 老、新叶片组织 tTG 酶活性的比较

粤泰 A 与粤泰 B 老、新叶片组织 tTG 酶活性的比较表明(图 3), 新、老叶片的 tTG 酶活性存在显著差异, 无论是粤泰 A 还是粤泰 B, 老叶片 tTG 酶活性都显著高于新叶片, 说明叶片衰老过程中 tTG 酶活性表现与凋亡组织相似的特征; 在粤泰 A 与粤泰 B 之间, 无论是老叶片还是新叶片, tTG 酶活性表现相似的特征, 没有显著差异。这一结果表明, 在红莲型细胞质雄性不育的体细胞组织部分, 不育系和保持系的 tTG 酶活性没有差异。

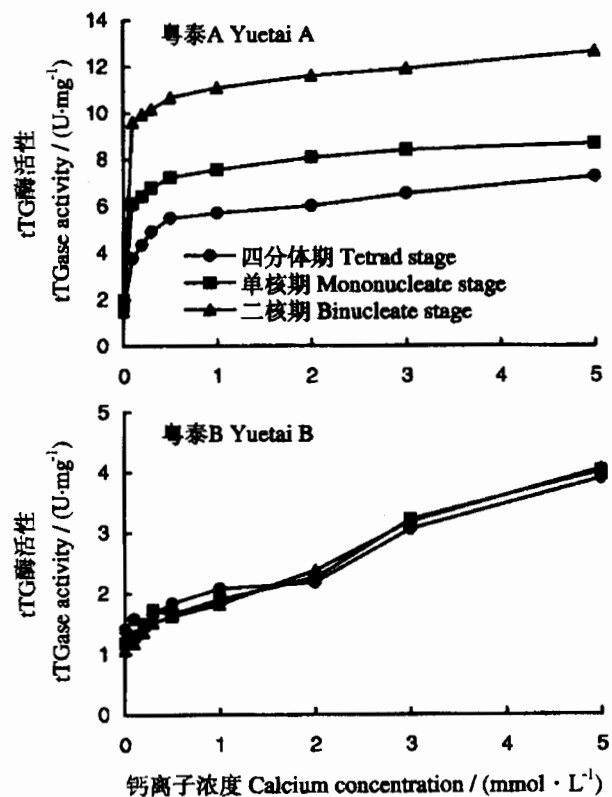


图 4 粤泰 A 不同时期穗子 tTG 酶的反应曲线
Fig. 4. Reaction curves of tissue transglutaminase in the panicles of Yuetai A and Yuetai B at different stages.

2.2.2 粤泰 A 与粤泰 B 幼穗发育不同时期 tTG 酶的活性比较

从不育系粤泰 A 和保持系粤泰 B 幼穗发育四分体、单核和二核期 tTG 酶活性的比较结果看(图 4),很明显,粤泰 A 四分体时期的 tTG 酶活性最低,而二核期的 tTG 酶活性最高,处于发育中间阶段的单核期的 tTG 酶活性介于四分体和二核期之间,这也说明随着发育的进程,从四分体到单核期,再到二核期,tTG 酶活性逐渐增加。从幼穗发育四分体时期到二核期,粤泰 B 中的 tTG 酶活性一直保持较低状态,而且,与粤泰 A 相比,粤泰 B 幼穗发育各时期 tTG 酶活性低很多。

3 讨论

3.1 红莲型细胞质雄性不育水稻粤泰 A、粤泰 B 中 tTG 酶与叶片衰老

tTG 酶活性增加是细胞凋亡的生化特征之一。在生长细胞中,tTG 酶活性很低;在发生凋亡的细胞中,tTG 酶活性逐渐增强。植物细胞程序性死亡的研究落后于动物,关于动物细胞程序性死亡过程中 TGase 的文献报道很多,而植物细胞程序性死亡的类似文献几乎没有。已经知道,tTG 酶在植物中广泛存在,在植物细胞分裂、茎尖顶端生长及植物胁迫反应中发挥重要作用。叶片衰老是植物叶片发育的最后阶段,是一个复杂的过程,其中包含着细胞的大量死亡。叶片的衰老是紧随细胞凋亡之后的生理过程,与细胞凋亡具有很多类似的代谢特征^[9]。叶片衰老被认为是属于程序性细胞死亡(programmed cell death 或 apoptosis)现象已有多年,但是分子生物学证据依然很少见。本试验研究证实,tTG 酶在相对衰老的叶片组织中活性较高,而在幼嫩的叶片组织中活性较低。这说明在 tTG 酶活性表现方面,叶片衰老过程与程序性死亡具有相同特征。另外,粤泰 A、粤泰 B 叶片中 tTG 酶活性比较也说明,花粉发育与叶片中 tTG 酶的活性没有直接联系,推测这可能与红莲型雄性不育属于配子体不育类型有关。

3.2 红莲型细胞质雄性不育水稻粤泰 A 花粉败育与 tTG 酶活性

有研究表明,红莲型水稻细胞质雄性不育属于配子体不育类型,小孢子败育时期较迟,多发生在二核或三核期^[10],其小孢子败育过程中细胞程序性死亡发生在小孢子母细胞时期^[3]。本试验结果与此一致(如图 4),不育系粤泰 A 在幼穗发育阶段,从四

分体到单核期再到二核期,tTG 酶的活性在不断上升,二核期达到最高,表明败育程度在不断加深。相对而言,在保持系粤泰 B 的幼穗发育不同时期,tTG 酶活性没有显著变化;而且与粤泰 A 相比,粤泰 B 幼穗中 tTG 酶的活性要低很多。比较叶片和幼穗中 tTG 酶的活性的变化还说明:红莲型细胞质雄性不育属于配子体不育类型。虽然幼穗的主要组成部分是体细胞组织,但是叶片试验结果说明,tTG 酶活性在粤泰 A 与粤泰 B 的体细胞组织中没有显著差异,因此,tTG 酶在粤泰 A、B 幼穗中的差异代表着花药或花粉中的差异。

多胺,主要是腐胺(putrescine)、亚精胺(spermidine)和精胺(spermine),在细胞生长及分化中起着重要作用^[11]。tTG 酶主要是通过催化蛋白质分子的谷氨酰胺残基或多胺与赖氨酸残基间的转谷氨酰胺反应使蛋白质分子发生交联,形成对蛋白水解作用很稳定的异肽键,增加组织对物理和化学作用的抵抗力。梁承邨等^[12]对三系杂交水稻研究表明,不育花药中腐胺、亚精胺和精胺含量均低于可育花药。根据本试验结果推测,不育花药中多胺含量低可能与 tTG 酶的作用有关。自四分体到单核期,再到二核期的幼穗发育阶段,tTG 酶活性逐渐增强,谷氨酰胺残基或多胺参加交联反应越多,必然导致组织中的多胺的减少,形成凝聚态蛋白质,最终导致花粉败育。因此,本试验结果与多胺含量变化的研究结果^[11]是一致的。

3.3 Ca^{2+} 对红莲型细胞质雄性不育水稻粤泰 A 花粉发育的影响

tTG 酶是细胞凋亡(程序性死亡)的重要特征酶之一^[4],随着凋亡过程的发展,tTG 酶活性逐渐增加,tTG 酶是依赖于 Ca^{2+} 的酶,在生活的正常细胞中,由于 Ca^{2+} 浓度较低($< 1 \mu\text{mol/L}$),tTG 酶的活性很低;当凋亡起始时, Ca^{2+} 浓度上升,从而使 tTG 酶活化。为什么红莲型细胞质雄性不育水稻粤泰 A 在幼穗发育过程中 tTG 酶活性会逐渐增强呢?利容干等^[13]利用焦锑酸钾沉淀法研究水稻红莲 粤泰不育系及其保持系花药发育过程中 Ca^{2+} 的分布变化的结果表明,当红莲 粤泰 B 花粉发育至二核期时,在花粉外壁周围分布着许多 Ca^{2+} 的沉淀颗粒,花粉内除积累大量淀粉外,胞内无 Ca^{2+} 沉淀颗粒。而不育系粤泰 A 败育花粉在这个时期突出的特点是:花粉不仅在外壁分布着许多 Ca^{2+} 沉淀颗粒,而且在液泡中也有大量 Ca^{2+} 的沉淀颗粒分布;同时花粉细胞质不断液泡化,花粉最终空瘪。据此

我们推测,红莲型细胞质雄性不育花粉败育过程中,花粉细胞质 Ca^{2+} 对花粉发育影响的主要方式之一是通过 tTG 酶发生作用。随花粉发育进程,花粉细胞质中 Ca^{2+} 浓度的增加,花粉中 tTG 酶活性增加,导致花粉中蛋白质发生交联反应,形成凝聚状态的蛋白质,最终表现败育。

另一方面,对于光敏核不育水稻农垦 58S 的研究表明,在雌雄蕊形成期和花粉母细胞形成期这两个对光最敏感的时期,长日照会引起细胞内 Ca^{2+} 含量增加。长日照下的农垦 58S 经 EGTA(Ca^{2+} 螯合剂)处理后,花粉育性部分恢复;喷施 Ca^{2+} 后,可育花粉率和结实率为零。在光敏核不育水稻中研究认为, Ca^{2+} 含量与花粉败育及育性恢复存在着很大的相关性。在光温敏核不育类型的水稻中,花粉败育过程确实存在细胞凋亡现象。目前认为 Ca^{2+} 与光信号传递关系密切,在光敏核不育水稻中, Ca^{2+} 是否也能通过对 tTG 酶活性的调节来改变花粉发育还需要深入研究。

水稻花粉败育是一个极其复杂的过程,在这个过程中涉及到一系列基因精密有序时空性表达,而对雄性不育与育性恢复机理的研究尚未达成一致性的结论。本试验结果表明 tTG 酶参与了花粉的败育过程,tTG 酶活性的变化作为细胞凋亡的标志之一,从另一个角度也辅证了花粉败育过程是一种细胞凋亡的观点。同时,在植物叶绿体和线粒体中也存在不同功能的 tTG 酶,叶绿体和线粒体都是细胞质中重要的细胞器,那么,细胞质中 Ca^{2+} 是通过叶绿体还是通过线粒体中的 tTG 酶的作用影响花粉发育还需要更多的实验依据。

参考文献:

[1] Balk J, Leaver C J. The PET1 CMS mitochondrial mutation in

sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *Plant Cell*, 2001, 13: 1803-1818.

- [2] Ku S, Yoon H, Suh H S, et al. Male sterility of thermosensitive genic male sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. *Planta*, 2003, 217(4): 559-565.
- [3] Li S Q, Wan C X, Kong J, et al. Programmed cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria. *Funct Plant Biol*, 2004, 31(4): 369-376.
- [4] 李平. 组织型转谷氨酰胺酶的研究进展. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24(5): 294-297.
- [5] Charles S G, Paul J B, Robert H R. Transglutaminases: multifunctional cross linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J*, 1991, 5: 3071-3077.
- [6] Lilley G R, Skill J, Griffin M, et al. Detection of Ca^{2+} -dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1115-1123.
- [7] Slaughter T F, Achyuthan K E, Lai T S, et al. A microtiter plate transglutaminase assay utilizing 5-(biotinamido)pentylamine as substrate. *Anal Biochem*, 1992, 205: 166-171.
- [8] Maria E C, Marina F. Tissue Transglutaminase. Purdue Cytometry CD-ROM Series, Volume 4. West Lafayette: Purdue University Cytometry Laboratories, 1997.
- [9] Serafini F D, Del D S, Monti F, et al. Transglutaminase activity during senescence and programmed cell death in the corolla of tobacco (*Nicotiana tabacum*) flowers. *Cell & Differ*, 2002, 9: 309-321.
- [10] 朱英国. 水稻雄性不育生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 2000: 104-112.
- [11] 杨筱珍, 陈耀星, 余锐萍, 等. 多胺与细胞凋亡. 动物医学进展, 2004, 25(2): 11-14.
- [12] 林植芳, 梁承邨, 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. 植物学报, 1993, 35(3): 215-221.
- [13] 利容千, 朱英国, 孟祥红, 等. 水稻红莲粤泰不育系花粉与药隔组织 Ca^{2+} 的分布. 作物学报, 2001, 27(2): 230-235.