

水稻二核期花药蛋白质组差异与花粉败育的相关性

文李^{1,2}, 陈颖¹, 刘佳³, 陶钧¹

(1.长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 2.湖南农业大学油料作物研究所, 湖南 长沙 410128; 3.教育部植物发育学重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘 要: 对红莲型细胞质雄性不育水稻小孢子发育二核期花药总蛋白质进行双向电泳分离, 通过考马斯亮蓝染色, 获得分辨率和重复性较好的双向电泳图谱。采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定 12 个蛋白质点, 液相色谱质谱/质谱联用技术鉴定另外 7 个蛋白质点, 这些蛋白质分别参与糖类物质的合成及代谢(5 个点)、蛋白质生物合成及代谢(3 个点)、转录(2 个点)、次生代谢产物合成(2 个点)、信号转导(1 个点)、细胞疾病和死亡(1 个点)及未知功能蛋白(5 个点)。除 1 个蛋白酶亚基(点 9)仅在不育系中表达外, 其他 18 个蛋白质点在不育系中缺失或表达量降低, 因而花粉发育过程中糖类及蛋白质的正常积累受到影响, 与花粉不能正常发育密切相关。

关 键 词: 水稻; 二核期花药; 蛋白质组; 花粉败育

中图分类号: S511.01 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2013)02-0126-05

Differences in expression of proteins from the binucleate-staged anthers of rice and its relationship with pollen abortion

WEN Li^{1,2}, CHEN Ying¹, LIU Jia³, TAO Jun¹

(1. Chemical and Biology Engineering College, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China; 2. Institute of Oilseed Crops, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan 430072, China)

Abstract: Total proteins expressed in binucleate stage anthers of Honglian rice CMS line during the development of microspores were separated by two-dimensional electrophoresis, through coomassie blue staining, two dimensional gel electrophoresis profiles with high resolution and reproducibility were obtained. Twelve protein spots were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) and 7 were identified by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Among these protein spots, 5 spots were involved in biosynthesis or metabolism of carbonhydroxydate, 3 spots involved in biosynthesis, 5 spots involved in transcription, 2 spots involved in biosynthesis of plant secondary metabolites, 2 spots involved signal transduction, 2 spots involved cell death/disease, and 5 spots with unknown function. Among these 19 protein spots, the expression of 18 spots were down-regulated or absent in the male-sterile line, only one spot, standing for a proteasome subunit (spot 9) was regularly expressed, indicating the abnormal accumulation of carbonhydroxydates and proteins in male-sterile line anthers during the development of pollens might relate to pollen sterility.

Key words: *Oryza sativa*; binucleate-staged anthers; proteome; pollen abortion

细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterile, CMS) 是受到细胞核和细胞质基因双重调控的母性遗传性状, 对 CMS 机理的研究将有助于深化对核质互

作的认识, 推动对成花机制和花粉发育等重大发育学问题的研究^[1]。虽然分子水平的研究以及相关基因的克隆, 有助于了解水稻雄性不育和育性恢复机

收稿日期: 2012-11-27

基金项目: 中国博士后基金特别资助项目(2012T50649); 中国博士后基金面上重点项目(20110490147); 湖南省科学技术厅项目(2011RS4007); 湖南省教育厅省重点学科建设项目(湘教发[2012]1 号)

作者简介: 文李(1971—), 女, 湖南岳阳人, 博士, 副教授, 主要从事植物蛋白质组学研究, superwenli@163.com

理^[2],但仍然不能解释 CMS 基因导致花粉功能丧失的机制。对于细胞质雄性不育比较成熟的假说是,植物小孢子发育过程中,花粉不能积累足够的淀粉而导致不育^[3],而花药绒毡层对花粉的发育起重要作用,绒毡层发育不正常可导致花粉不育^[4]。

水稻红莲型细胞质雄性不育材料主要表现为小孢子发育二核期花粉败育^[5],笔者在对红莲型细胞质雄性不育水稻小孢子发育四分体时期^[6]和单核期花药总蛋白质^[7]比较研究的基础上,利用蛋白质组技术继续对小孢子发育过程二核期花药总蛋白质进行比较分析。结合双向电泳和质谱技术,通过比较不育系和保持系蛋白质表达的差异并鉴定差异蛋白,探讨不育系花粉败育的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

红莲型水稻细胞质雄性不育保持系(粤泰 B)和不育系(粤泰 A),取自武汉大学试验田。参照文献^[8]选取水稻小孢子发育二核期穗子,于 4 °C 下小心挑出花药,置 -70 °C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 提取花药蛋白质

参照文献^[6]花药蛋白质的提取及水化方法,并

以牛血清白蛋白作标准曲线,参照文献^[9]的方法,测定蛋白质浓度。

1.2.2 双向电泳及凝胶成像

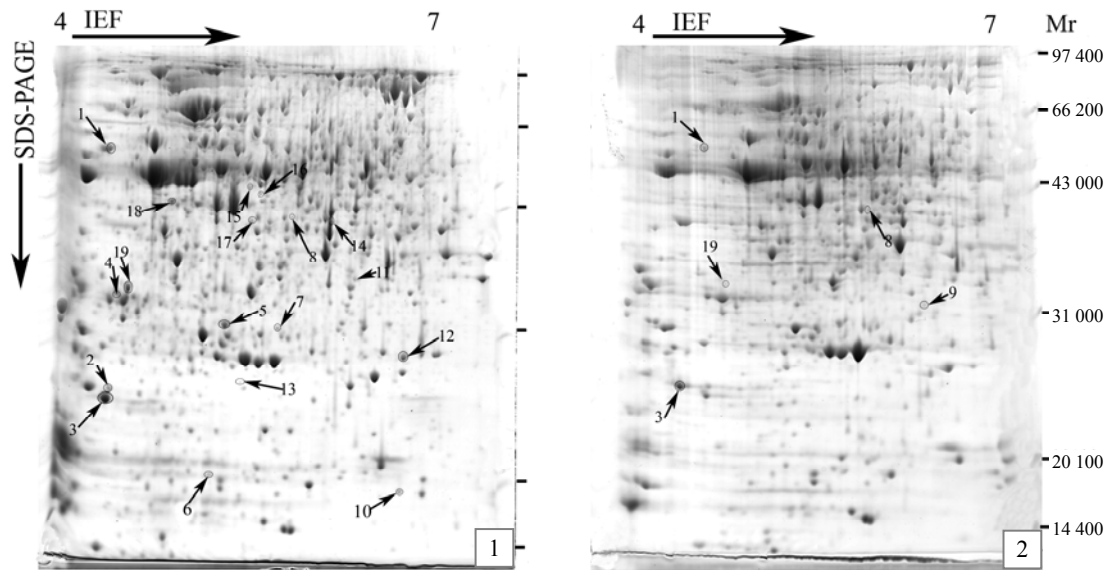
等点聚焦(IEF,采用固相胶条 pH4~7,18 cm)、SDS-PAGE 及考染显色按照文献^[6]的方法进行,重复 3 次。通过 PDQuest 8.0 图像分析软件对不同的电泳图谱进行匹配分析,并计算出每个点的丰度、3 次重复中差异点丰度的平均值及粤泰 A 对粤泰 B 的比率倍数。对 3 次重复表达差异倍数为 2.0 以上 ($P<0.05$) 的点进行 MS 或者 MS/MS 分析。

1.2.3 2D 胶蛋白质点的酶解、质谱分析及生物信息学分析

参照文献^[6]的方法进行。

2 结果与分析

对二核期花药总蛋白质 2DE 分离 结果见图 1。通过软件分析比较后发现,25 个蛋白质点在粤泰 A 和粤泰 B 中差异表达;对其进行质谱分析,其中 10 个点通过 MALDI-TOF/MS 分析得到了鉴定。对 15 个未被鉴定的点继续进行 LC-MS/MS 分析,其中有 7 个点被鉴定,对质谱鉴定的蛋白质点进行编号,在图 1 中用箭头标出,已鉴定蛋白质信息见表 1。



1 保持系; 2 不育系。

图 1 红莲型水稻小孢子发育二核期花药蛋白质 2DE 图谱

Fig. 1 Representative 2DE maps of the total anther proteins at the binucleate stage of microspore development

表1 水稻花药差异表达蛋白质质谱鉴定及数据库搜索结果

Table 1 Differentially accumulated proteins in rice anthers during binucleate stages identified by mass spectrometry analysis and database searching

蛋白质点	登录号	蛋白质名称及来源物种	功能	分值	覆盖率/ %	粤泰 A 与 粤泰 B 丰度比
1	gi 52353519	Beta-N-acetylhexosaminidase, <i>Oryza sativa</i>	biosynthesis of starch	77	25	0.0±0.00
2	gi 51091339	putative chaperonin 21 precursor, <i>Oryza sativa</i>	protein biosynthesis	68	21	0.0±0.00
3	gi 18767385	hypothetical protein, <i>Oryza sativa</i>	unknown	80	38	0.5±0.06
4	gi 18642696	hypothetical protein, <i>Oryza sativa</i>	unknown	75	42	0.0±0.00
5	gi 7208420	phosphate transporter, <i>Oryza sativa</i>	signal transduction	85	24	0.0±0.00
7	gi 108707977	hydroxyacylglutathione hydrolase, putative expressed, <i>Oryza sativa</i>	biosynthesis of secondary plant metabolites	76	30	0.0±0.00
9	gi 46275847	20S proteasome beta 4 subunit, <i>Oryza sativa</i>	protein biosynthesis	69	37	∞
10	gi 108707807	unknown protein, <i>Oryza sativa</i>	unknown	88	25	0.0±0.00
13	gi 50921515	OSJNBb0005B05.11, <i>Oryza sativa</i>	unknown	76	32	0.0±0.00
14	gi 5103729	knotted1-type homeobox protein OSH71, <i>Oryza sativa</i>	transcription	70	34	0.0±0.00
18	gi 33113259	enolase, <i>Oryza sativa</i>	carbohydrate metabolism	207	40	0.0±0.00
19	gi 5529765	hypothetical protein, <i>Oryza sativa</i>	unknown	63	32	0.3±0.05
6	gi 40714662	actin, <i>Oryza sativa</i>	cell death/disease	88	24	0.0±0.00
8	gi 28564795	proteasome inhibitor, <i>Oryza sativa</i>	protein biosynthesis	397	28	0.4±0.05
11	gi 50923829	carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase, <i>Oryza sativa</i>	biosynthesis of plant secondary metabolites	347	16	0.0±0.00
12	gi 54287460	putative acid phosphatase, <i>Oryza sativa</i>	transcription	155	20	0.0±0.00
15, 16	gi 51854319	ADP-glucose pyrophosphorylase large chain, <i>Oryza sativa</i>	biosynthesis of starch	128	25	0.0±0.00
17	gi 403081501	hypothetical protein, <i>Oryza sativa</i>	carbohydrate metabolism	140	31	0.0±0.00

点 5、11 和 18 的鉴定结果与文献[6]结果一致；“∞” 示蛋白质点在粤泰 B 中缺失。

19 个蛋白质点被鉴定为 18 个蛋白质，其中点 15 和 16 被鉴定为同一个蛋白质。19 个蛋白质分别参与糖类物质的合成/代谢(点 1、15、16、17 和 18)、蛋白质的生物合成/代谢(点 2、8 和 9)、次生代谢产物合成(点 7 和 11)、转录(点 12 和 14)、细胞疾病和死亡(点 6)及信号转导(点 5)，此外尚有 5 个蛋白质功能未知(点 3、4、10、13 和 19)。所有已鉴定蛋白质除点 9 外，均在不育系粤泰 A 中缺失或表达下调，而在保持系粤泰 B 中特异表达或上调；其中点 3、8 和 19 在不育系中的表达量分别为可育系中的 50%、30%和 40% 其他 15 个蛋白质点均在不育系中缺失。

3 讨论

本研究结果表明，与碳代谢和氮代谢相关的蛋白质在不育系中表达下调或缺失，可能导致花粉发育过程中 ATP 和蔗糖减少，从而导致底物不足，进一步影响能量不足，最终导致花粉败育^[10]。ADP-

葡萄糖磷酸转移酶亚基(ADP-Glc PPase，点 15 和 16)，是淀粉合成关键酶，高等植物的 ADP-Glc PPase 由起调节作用的大亚基和起催化作用的小亚基两部分组成^[11]。淀粉的生物合成关键步骤为葡萄糖-1-磷酸(Glucose-1-phosphate)转变成 ADP-葡萄糖(ADP-glucose)，该关键步骤由 ADP-Glc PPase 催化(ATP+alpha-D-glucose 1-phosphate= diphosphate + ADP-glucose)，ADP-葡萄糖作为淀粉合成的糖基供体^[12]。本研究中，不育系花药中 ADP-Glc PPase 大亚基缺失，使得淀粉的合成受到影响。淀粉是花粉发育和萌发过程中为其提供可溶性糖的重要储备物，在雄性不育系花粉发育过程中，淀粉积累过早终止最终导致花粉败育^[13]。Datta 等证明玉米花粉发育受 ADP-Glc PPase 表达量的影响^[4]。在本研究中，CMS 水稻二核期花药中 ADP-Glc Ppase 大亚基缺失，可能使淀粉合成水平降低，从而影响花粉发育，此结果与前期对小孢子发育四分体时期和单核

期花药蛋白质组的研究结果一致。

肌动蛋白(点 6)在不育系中缺失。肌动蛋白是真核生物微丝的主要组成物,在植物细胞发育中起着重要的作用,其在花药中的分布不仅与花粉发育密切相关,还影响花粉萌发过程中花粉管的形成^[14]。肌动蛋白介导的细胞骨架重塑在花粉发育过程中的有丝分裂和细胞延长以及花粉萌发过程中的花粉管生长均起作用^[15]。关和新等^[16]发现在马协型细胞质雄性不育系花药中导管缺乏和筛管减少,推测不育系花药维管束结构异常导致其营养运输功能缺陷,从而导致花粉因营养匮乏而败育。笔者推测在红莲型细胞质雄性不育系花药中微管束发育异常,与花粉败育密切相关。

有研究表明,在油菜^[17]和红莲型 CMS 水稻^[18]中,因花药糊粉层细胞的非正常细胞程序化死亡(programmed cell death, PCD)而导致了花粉败育。本研究发现 1 个蛋白酶亚基(点 9)仅在不育系表达,而在保持系中缺失,此蛋白酶亚基可能与 PCD 相关。在植物中,蛋白质水解和氧胁迫相关,活性氧(ROS)能促进蛋白质水解^[19]。因为氧胁迫环境中,细胞内蛋白质易被氧自由基氧化,而被氧化的蛋白质优先被水解酶识别并水解^[20]。ROS 本身在植物 PCD 过程中可能起两个方面的作用:一是作为信号分子启动细胞内的某些级联反应,最后导致细胞死亡^[2];二是作为有毒分子可以直接杀死植物细胞,这在植物防御反应中起重要作用,氧化迸发产生的高浓度 ROS 在植物细胞中的积累能杀死受伤区域的边际部位细胞,阻止受伤部位的扩散,从而将植物体损失减少到最小^[21-22]。Wan 等^[8]发现红莲型水稻不育系四分体时期花药内 ROS 相对于保持系有大幅度增加,表明 ROS 作为信号下调了小孢子发育时期起重要作用的抗氧化酶系的表达。ROS 的持续积累导致了氧化胁迫超出了抗氧化系统的承受能力,反过来又加剧小孢子发育过程中的细胞伤害。笔者推测不正常 ROS 的积累会导致对各种生物大分子的氧化伤害,例如细胞膜蛋白的过氧化,从而导致蛋白质结构被破坏,这些被破坏的蛋白质被蛋白水解酶识别并水解。由此推测,红莲型不育水稻花粉败育过程是一个由 ROS 缓慢积累而导致的异常细胞程序性死亡过程,蛋白酶亚基仅在不育系中

表达,可能与不育系中大幅度增加的 ROS 相关,从而也和小孢子的异常 PCD 相关。

此外,还有一些蛋白质被发现在不育系中表达缺失,可能也与花粉败育相关,如分子伴侣蛋白(putative chaperonin 21 precursor, Cpn 21, 点 2)与蛋白质合成相关。*Cpn21* 在植物生长发育中起着重要的作用,抑制 *Cpn21* 基因的表达可导致烟草和番茄种子败育^[23]。

除以上与代谢、蛋白质合成以及调节功能相关的蛋白质外,本研究还发现不育系与可育系中还有很多其他差异表达的蛋白质。这些蛋白质参与转录、信号转导、细胞结构以及细胞死亡/疾病等。这些蛋白质在不育系和可育系之间的差异表达说明它们与细胞质雄性不育和育性恢复具有一定的关联,因而需要更进一步验证和解释其中的关联。

参考文献:

- [1] Dewey R E, Levings C S, Timothy D H. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm [J]. *Cell*, 1986, 44(3): 439-449.
- [2] Peng X, Wang K, Hu C, et al. The mitochondrial gene orfH79 plays a critical role in impairing both male gametophyte development and root growth in CMS-Honglian rice [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 125-135.
- [3] Datta R, Chamusco K C, Chourey P S. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 1645-1656.
- [4] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(Suppl): 154-169.
- [5] 文李, 刘盖, 王坤, 等. 红莲型二核期花粉蛋白质组学分析 [J]. *华南师范大学学报: 自然科学版*, 2012, 44(2): 115-119.
- [6] Wen L, Liu G, Li S Q, et al. Proteomic analysis of anthers from Honglian cytoplasmic male sterility line rice and its corresponding maintainer and hybrid [J]. *Botanical Studies*, 2007, 48(3): 293-309.
- [7] 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.
- [8] Wan C, Li S, Wen L, et al. Damage of oxidative stress on mitochondria during microspores development in Honglian CMS line of rice [J]. *Plant Cell Rep*, 2007,

- 26(3) : 373–382 .
- [9] Bradford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J] . Anal Biochem , 1976 , 72 : 248–254 .
- [10] Teixeira R T , Knorpp C , Glimelius K . Modified sucrose , starch , and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B . napus*[J] . J Exp Bot , 2005 , 56 : 1245–1253 .
- [11] Cross J M , Clancy M , Shaw J R , et al . A polymorphic motif in the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase modulates interactions between the small and large subunits[J] . Plant J , 2005 , 41(4) : 501–511 .
- [12] Koller A , Washburn M P , Lange B M , et al . Proteomic survey of metabolic pathways in rice[J] . Proc Natl Acad Sci USA , 2002 , 99(18) : 11969–11974 .
- [13] Wen L , Ruesch K L , Ortega V M , et al . A nuclear restorer-of-fertility mutation disrupts accumulation of mitochondrial ATP synthase subunit alpha in developing pollen of S male-sterile maize[J] . Genetics , 2003 , 165(2) : 771–779 .
- [14] Bou Daher F , van Oostende C , Geitmann A . Spatial and temporal expression of actin depolymerizing factors ADF7 and ADF10 during male gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*[J] . Plant Cell Physiol , 2011 , 52(7) : 1177–1192 .
- [15] Bou Daher F , Geitmann A . Actin is involved in pollen tube tropism through redefining the spatial targeting of secretory vesicles[J] . Traffic , 2011 , 12(11) : 1537–1551 .
- [16] 关和新 , 朱英国 . 马协不育系花药超微结构观察[J] . 作物学报 , 2000 , 26 : 913–916 .
- [17] Gonzalez-Melendi P , Uyttewaal M , Morcillo C N , et al . A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in Ogu-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*)[J] . J Exp Bot , 2008 , 59(4) : 827–838 .
- [18] 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[J] . Functional Plant Biology , 2004 , 31(4) : 369–376 .
- [19] Yun L J , Chen W L . SA and ROS are involved in methyl salicylate-induced programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*[J] . Plant Cell Rep , 2011 , 30(7) : 1231–1239 .
- [20] Brohem C A , Massaro R R , Tiago M , et al . Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death[J] . Pigment Cell Melanoma Res , 2012 , 25(3) : 354–369 .
- [21] Peng X , Li F , Li S , et al . Expression of a mitochondrial gene *orfH79* from the CMS-HongLian rice inhibits *Saccharomyces cerevisiae* growth and causes excessive ROS accumulation and decrease in ATP[J] . Biotechnol Lett , 2009 , 31(3) : 409–414 .
- [22] Hu C , Sun Q , Peng X , et al . Flow cytometric analysis of mitochondrial populations in HL-CMS systems of rice under H₂O₂ stress[J] . Protoplasma , 2010 , 241(1–4) : 91–98 .
- [23] Hania U , Velcheva M , Or E , et al . Silencing of chaperonin 21 , that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes , promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits[J] . Transgenic Res , 2007 , 16(4) : 515–525 .

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗维