

水稻无侧根突变体生理生化变化的研究

张 霞¹, 黄 斌¹, 李 洋¹, 郝再彬^{1,2*}

(1. 桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004; 2. 东北农业大学 生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 对水稻无侧根突变体 RM109, 原品种大力及杂交后代 F1 三者的部分生理指标进行了比较。包括抗氧化酶(SOD、POD、CAT)和琥珀酸脱氢酶(SDH)的活性及叶绿素、丙二醛(MDA)、脯氨酸(Pro)等的含量, 以及可溶性蛋白质的电泳分析。结果表明: RM109 超氧化物歧化酶(SOD)活性为大力的 50%, F1 为大力的 72%; RM109 过氧化物酶(POD)活性比大力高 125%, F1 的比大力低 3%; RM109 过氧化氢酶(CAT)活性为大力的 56%, F1 为大力的 11%; RM109 琥珀酸脱氢酶活性为大力的 60%, 差异都极显著。揭示了基因突变后引发的生理生化变化, 从中探讨突变机理。

关键词: 水稻; 侧根突变体; 酶活性; 蛋白质电泳

中图分类号: S511.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2012)01-0124-05

Physiological and biochemical changes in lateral root mutant of rice

ZHANG Xia¹, HUANG Bin¹, LI Yang¹, HAO Zai-Bin^{1,2*}

(1. *Department of Chemical and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China;*
2. *College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*)

Abstract: The activities of super oxide dismutase(SOD), peroxidase(POD), catalase(CAT) and succinate dehydrogenase(SDH), the content of chlorophyll, malondialdehyde(MDA), and proline(Pro), and the electrophoresis of soluble protein were compared among no lateral root mutant(RM109), original varieties(Oochikara) and their hybrids(F1). The results showed that SOD activity of Oochikara was stronger than RM109 by 50%, F1 was 72% of Oochikara; the POD activity of RM109 was higher than Oochikara by 125%, F1 was lower than Oochikara by 3%; the CAT activity of RM109 was 56% of Oochikara, F1 was only 11% of Oochikara; the SDH activity of RM109 was 60% of Oochikara. All above differences were up to be very significant. All of the revealed characteristics changes in physiology and biochemics might be caused by the gene mutation.

Key words: rice; lateral root mutation; enzymatic activity; protein electrophoresis

超级杂交水稻育种是我国水稻育种的前沿课题,也是当前一项世界性的热门课题,世界各国陆续开展了水稻超高产育种的研究,我国已取得了很大的进展(许明等,2010)。虽然目前已有一些超级稻组合通过省级审定并进入大面积生产,但都不同程度地存在结实不稳定和充实度较差的问题,在一定

程度上限制了水稻超高产优势的发挥。要解决这一难题,从生理育种的角度进行研究是十分必要的。

其中突变体研究是植物遗传学的重要研究手段之一,我们曾对无侧根突变体 RM109 形成和 2,4-D 耐性(郝再彬等,2004)、农艺性状、冠根的解剖学观察、根的斜向重力性生长等进行了实验与分析。为

收稿日期: 2011-04-02 修回日期: 2011-07-31

基金项目: 广西自然科学基金(桂科回 0731021); 桂林理工大学科研启动费[Supported by Natural Science Foundation of Guangxi(GSR0731021); Start Funds of Scientific Research in Guilin University of Technology]

作者简介: 张霞(1978-),女,山东烟台人,硕士研究生,主要从事植物化学研究。(E-mail)sunnyzhangxia@163.com。

* 通讯作者: 郝再彬,男,教授,博士生导师,主要从事生物活性物质的研究。(E-mail)haozaibin2010@126.com。

了进一步解析无侧根突变体 RM109 的突变机理, 本实验对 RM109 和原品种大力及杂交后代 F1 三者的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、琥珀酸脱氢酶(SDH)活性以及叶绿素、丙二醛(MDA)、脯氨酸(Pro)、水溶性蛋白质、可溶性糖和淀粉的含量进行了研究比较, 同时比较了叶片中可溶性蛋白质的电泳图谱, 通过揭示基因突变后引发的生理生化特性变化, 从中了解突变机理, 进而推进生理育种的研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

粳稻品种大力(*Oryza sativa* cv. Oochikara), 无侧根突变体(RM109), 原品种为父本、突变体为母本的杂交后代(F1)。

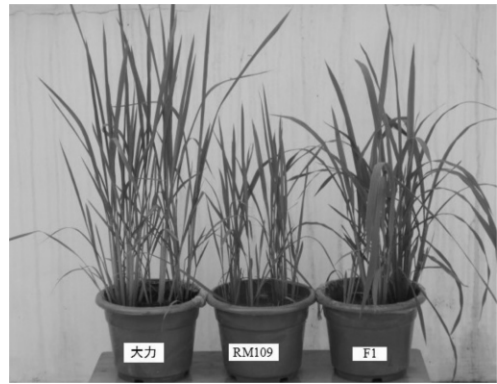


图 1 盆栽大力、突变体及杂交体
Fig. 1 Oochikara, RM109 and Hybrid F1

1.2 实验设计

实验如图 1 所示, 采用盆栽的方法, 选用直径 0.3 m、高 0.25 m 均匀一致的盆, 内装 5 kg 稻田土。*Oryza sativa* cv. Oochikara, RM109, 杂交后代 F1

表 1 大力、RM109、F1 的 SOD、POD、CAT 活性

Table 1 The SOD, POD, CAT activity of Oochikara, RM109 and F1 ($U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)

Enzymatic	Oochikara	RM109	F1
SOD 活性 SOD activity	43.32±0.01(100)	21.66±0.03(50) **	31.19±0.02(72) **
POD 活性 POD activity	17.49±0.02(100)	39.30±0.05(225) **	17.01±0.01(97)
CAT 活性 CAT activity	5.87±0.04(100)	3.29±0.03(56) **	0.62±0.05(11) **

注: 表中所列结果为平均值±标准差; **表示 RM109 和 F1 与对照大力有显著差异的置信概率为 $P=0.01$, 下同。对照下 Oochikara 的超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶的活性均为 100%。

Notes: Results are expressed as the mean±standard deviation; figures in the fier followed by the same capital letter are not different at $P=0.01$, the data are based on the SOD, POD and CAT activity of Oochikara which is 100%.

各种植 10 盆。各品种分别于抽穗开始取样, 各品种取长势一致的 6 株稻株, 将其最上 3 片叶片即剑叶、倒二叶、倒三叶剪碎, 进行各指标的测定。3 次重复。

1.3 实验方法

1.3.1 各种酶活性的测定 SOD 活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)法。POD 活性的测定采用愈创木酚法, 参照李合生(2000)的方法并略作修改。酶活性以每分钟 $OD_{470\text{nm}}$ 增加 0.01 所需酶量定为 1 个活力单位, 用 $U/(g \cdot min)$ 表示。过氧化氢酶(CAT)活性的测定采用紫外吸收法(郝再彬等, 2006), 酶活性以每分钟 $OD_{240\text{nm}}$ 降低 0.1 所需酶量定为 1 个活力单位, 用 $U/(g \cdot min)$ 表示。琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的测定按照郝再彬等(2002)的方法进行并略作改动。

1.3.2 叶绿素、丙二醛(MDA)、脯氨酸(Pro)、水溶性蛋白质、可溶性糖、淀粉的含量测定 叶绿素、丙二醛采用分光光度法(郝再彬等, 2006); 脯氨酸采用

茚三酮法; 水溶性蛋白采用考马斯亮兰 G-250 法(张志良等, 2003); 可溶性糖采用紫外分光光度法; 淀粉采用分光光度法, 用种子做实验材料, 参照郭冬生等(2007)的方法进行并略作改动。

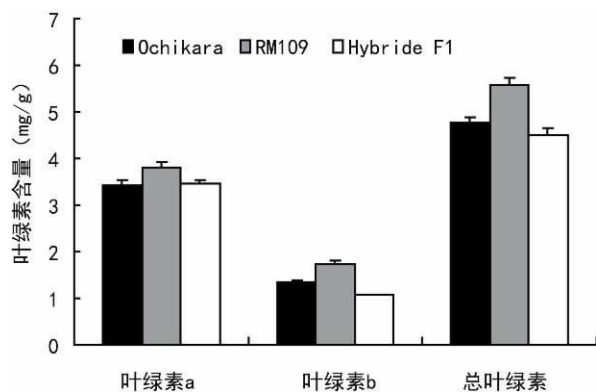
1.3.3 蛋白质电泳 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳法(Nobuhiro 等, 2003; 樊庆鲁等, 2010), 浓缩胶 5%, 分离胶 12%, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸(pH8.13)。电泳时的电流强度: 浓缩胶 10 mA, 分离胶 20 mA, 电泳过程中保持电流稳定, 5~6 h 后, 当样品中所含的溴酚蓝指示剂迁移至下沿约 1 cm 处即停止电泳。

2 结果与分析

2.1 抗氧化酶活性的变化

大力、RM109、F1 在抗氧化酶活性上存在明显差异。RM109 超氧化物歧化酶活性为大力的

50%, 杂交体 F1 超氧化物歧化酶活性为大力的 71.9%。RM109 过氧化物酶活性为大力的 224.75%, F1 过氧化物酶活性为大力的 97.21%。RM109 过氧化氢酶活性为大力的 56.03%, F1 为大力的 11%(表 1)。由此推断突变体 RM109 的氧化还原酶系发生了明显地变异。



1 图 2 不同类型水稻植株中叶绿素的含量

Fig. 2 Chlorophyll Content of Different Type of Rice

2.2 叶绿素含量的变化

植物体内叶绿素含量的高低与光合作用水平的强弱密切相关(石贵玉等, 2005)。RM109 的叶绿素比大力增加了 17.0%, F1 的比大力减少 6.0%。对于叶绿素 a 与 b 而言, 也具有同样的趋势: RM109 叶绿素 a 比大力增加了 11%, F1 与大力基本相同; RM109 叶绿素 b 含量比大力增加了 32%, F1 却仅为大力的 80%。RM109 中叶绿素 a 与 b 的比值是三种水稻中最小的(图 2), 说明 RM109 的叶绿素合成也发生了突变(李萍萍等, 2010)。

2.3 琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的测定

TTC 处理根 30 min 后, 大力的分生区、伸长区和中心柱以内组织都被染以较长(1.2mm)的红色; RM109 只有分生区被染为较短(0.7 mm)的红色, F1 的分生区和部分被染为较短红色, RM109 的红色长度和 SDH 活性都为大力的 60%, F1 为大力的 75%(表 2)。琥珀酸脱氢酶(SDH)是三羧酸循环中唯一掺入线粒体内膜的酶, 与呼吸代谢有关(郝再彬

表 2 大力和 RM109 的琥珀酸脱氢酶活性

Table 2 The succinate dehydrogenase activity of Oochikara, RM109 and F1(TTF $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{fw root g}^{-1}$)

所测成分	Oochikara	RM109	F1
根尖红色长度 Red length (mm)	1.2 \pm 0.1(100)	0.7 \pm 0.1(62) **	0.9 \pm 0.1(75) ** *
琥珀酸脱氢酶活性 SDH activity	19.5 \pm 1.9(100)	11.7 \pm 0.3(60) **	13.8 \pm 0.7(71) ** *

注: 对照下 Oochikara 的根尖红色长度、琥珀酸脱氢酶活性均为 100%。

Note: The data are based on the SDH activity of Oochikara, which is 100%.

表 3 大力、RM109、F1 的丙二醛(MDA)与脯氨酸(Pro)含量

Table 3 The MDA and Pro content of Oochikara, RM109 and F1

所测成分	Oochikara	RM109	F1
丙二醛 MDA ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	11.04 \pm 0.32(100)	13.58 \pm 0.28(123) **	24.71 \pm 0.42(224) ** *
脯氨酸 Pro ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	59.54 \pm 0.15(100)	99.81 \pm 0.08(168) **	86.91 \pm 0.02(146) ** *

注: 对照下的 Oochikara 的丙二醛、脯氨酸的含量均为 100%。

Note: The data in brackets are based on the MDA and Pro content of Oochikara, which is 100%.

等, 2002)。RM109 琥珀酸脱氢酶的异常进一步说明该突变体氧化磷酸化的能量代谢系统发生了突变。

2.4 丙二醛(MDA)与脯氨酸(Pro)含量的变化

在正常的生理状态下, 氧自由基的产生与清除处于动态平衡。若这种平衡被打破, 则大量的氧自由基蓄积于体内, 就可引起组织的病理损伤。MDA 是反映机体自由基和过氧化损伤的重要指标。MDA 为过氧化代谢的终产物, 其含量反映氧自由基损伤程度(王卫东等, 2007; 陈银萍等, 2010)。RM109 的丙二醛含量为大力的 123%, F1 为大力的

224%, 二者的丙二醛含量明显高于原品种大力; RM109 和 F1 脯氨酸的含量分别为大力的 168% 和 146%, 二者的抗逆性远高于原品种大力(表 3)。

2.5 水溶性蛋白质、淀粉及可溶性糖的含量

水溶性蛋白质所用牛血清蛋白标准曲线和测淀粉及可溶性糖所用葡萄糖标准曲线如图 3。实验测得无侧根突变体 RM109 水溶性蛋白质含量为大力的 50%, F1 为大力的 72%; RM109 淀粉的含量为大力的 168%, F1 为大力的 97%; RM109 可溶性糖的含量为大力的 145%, F1 为大力的 119%(表 4)。由此可见, 侧根基因的缺失对于碳水化合物的代谢

表 4 大力、RM109、F1 水溶性蛋白质和淀粉的含量
Table 4 The Water-soluble protein and Starch of Oochikara, RM109 and F1 (mg g⁻¹)

所测成分	Oochikara	RM109	F1
蛋白质 Protein	43.32±0.01(100)	21.66±0.03(50) **	31.19±0.09(72) **
淀粉 Starch	17.49±0.03(100)	29.30±0.03(168) **	17.01±0.02(96)
可溶性糖 Soluble sugar	6.63±0.01(100)	9.61±0.01(145) **	7.95±0.06(119) **

注：对照下 Oochikara 的水溶性蛋白质和淀粉的含量均为 100%。

Note: The data in brackets are based on the water-soluble protein and starch of Oochikara, which is 100%.

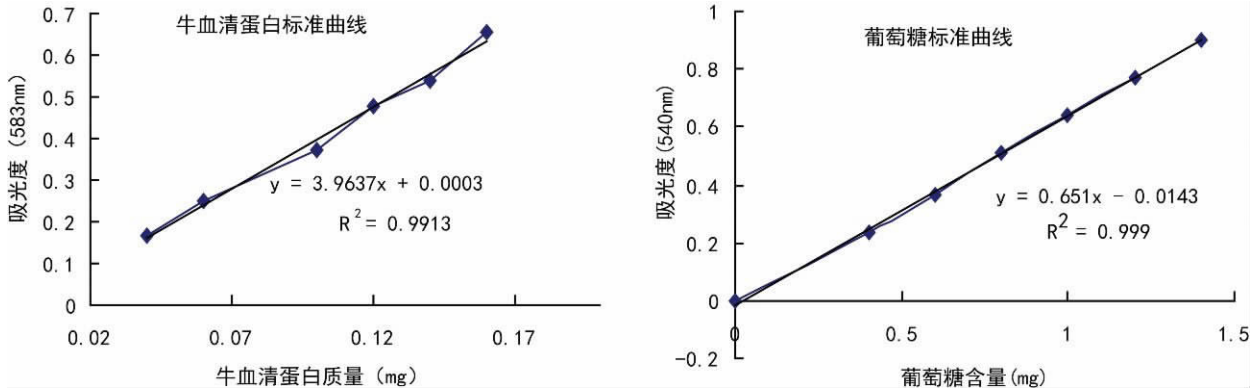


图 3 牛血清蛋白和葡萄糖标准曲线

Fig. 3 Standard Curve of Bovine Serum Albumin and Glucose

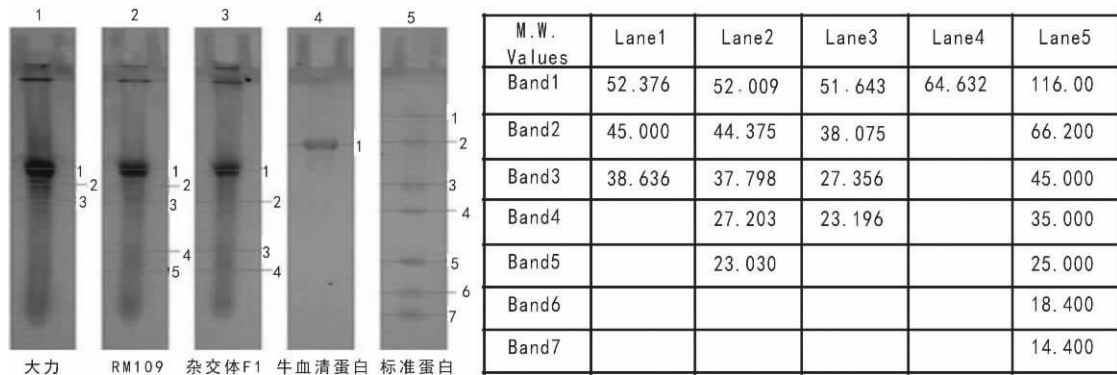


图 4 大力、RM109、杂交体 F1 蛋白质电泳图谱

Fig. 4 Protein Bands of Ochikara, RM109, Hybride F1

影响相对较大。

2.6 SDS-PAGE 电泳分析样品间蛋白质差别

分别提取大力、RM109 及 F1 叶片中的蛋白质，进行 SDS-PAGE 电泳分析，结果如图 4 所示，泳道 1 的大力出现三条谱带；泳道 2 的 RM109 出现五条谱带；泳道 3 的 F1 出现四条谱带；泳道 4 和 5 为标准蛋白。RM109 中出现的谱带 4 和 5，分子量分别为 27.203 和 23.030 的蛋白在大力中没有出现；在大力和 RM109 中出现的谱带 2，分子量为 45.000 和 44.375 的蛋白却没在 F1 中的相同位置出现，相

对于大力而言，RM109 和 F1 中的谱带更为相似，差别不明显。这表明 RM109 和 F1 的遗传基因相对于大力都有所改变。由于突变体所具有的无侧根性状，使突变体在发育过程中缺少足够的水分和矿物质，这必将影响其物质的积累，使二者在蛋白的表达方面差距越来越大(白月等, 2006)。

3 结论与讨论

在同一环境条件下，生物学性状可以反映材料

损伤和遗传变异的状况。本研究结果表明,无侧根突变体 RM109 与对照相比,叶片中的 POD 酶活高于对照,MDA 的含量高于对照,Pro 与淀粉及可溶性糖的含量也高于对照,而 SOD、CAT 和 SDH 酶活却低于对照,同时蛋白质含量也低于对照。究其原因,酶活的变化可能是由于机体本身激活了酶保护系统,启动了酶修复机制。而酶是基因产物,是基因表达的结果。

当生物体在某种不良条件下自由基的产生和清除失去了平衡,不论是自由基的产生增多还是机体清除自由基的能力减弱或二者兼而有之,均会对生物体造成损害。如果这种损害发生在与遗传有关的生物大分子如 DNA,则有可能造成基因突变(肖强等,2008)。这种自由基清除产生的平衡打破和重新建立,可能是生物体自然突变的原动力之一。

另外诱变因子被认为是引起突变的主要机理之一(樊庆鲁等,2010)。诱变引起的 DNA 损伤和修复会使细胞在代谢和遗传等方面发生变化,这种变化可以从蛋白质(酶类)表达上反映出来。侧根突变后引起的酶的变化有可能是化学诱变引起的 DNA 的变化,它究竟是在转录水平还是在翻译水平上起作用,还是由于结构基因的突变或者合成蛋白质调控系统的变化,仍有待进一步研究。

参考文献:

李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社:62-68

张志良,翟伟菁. 2003. 植物生理学实验指导[M]. 第3版. 北京:高等教育出版社

郝再彬,苍晶. 2006. 植物生理实验[M]. 第2版. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社

Bai Yue(白月),Wang Xun(王珣),Hao ZB(郝再彬). 2006. Analysis of proteomics of less-lateral-root mutant MT10 and its wild type IR8 by two dimensional electrophoresis(水稻少侧根突变体 MT10 的双向电泳分析)[J]. *J Northeast Agric Univ(东北农业大学学报)*,**37**(4):441-443

Chen YP(陈银萍),Tao L(陶玲),Yang L(杨莉),*et al.* 2010. Effects of nitric oxide on seed germination and physiological reaction of maize seedlings under water stress(一氧化氮对水分胁迫下玉米种子萌发及幼苗生理特性的影响)[J]. *Guihaia(广西植物)*,**30**(5):672-677

Fan QL(樊庆鲁),Xiao GY(肖国樱). 2010. Differentially expressed gene of indica/javanica recombinant inbred line in rice at early stage of PEG stress(水稻籼爪重组自交系 PEG 胁迫早期基因差异表达分析)[J]. *Guihaia(广西植物)*,**30**(4):538-543

Guo DS(郭冬生),Peng XL(彭小兰). 2007. Comparative study on antrone chromametry and enzymatic hydrolysisfor assay starch method(蒽酮比色法和酶水解法两种淀粉测定方法的比较研究)[J]. *J Hunan Univ Arts Sci: Nat Sci Edi(湖南文理学院学报·自然科学版)*,**9**(3):34-37

Hao ZB(郝再彬),Cang J(苍晶),Sun Xin(孙鑫),*et al.* 2002. Oxidation coxidize metabolism in the rice altered lateral root mutant RM109(水稻无侧根突变体 RM109 的氧化还原代谢)[J]. *Acta Agric Nucl Sin(核农学报)*,**16**(4):193-196

Hao ZB(郝再彬),Zhu GY(朱国英),Zhang D(张达),*et al.* 2004. The isolation of carbonate resistance mutants in rice and wheat(水稻、小麦碳酸盐耐性突变体的筛选)[J]. *J Northeast Agric Univ(东北农业大学学报)*,**35**(1):74-76

Li PP(李萍萍),Cheng GF(程高峰),Zhang JH(张佳华). 2010. Effects of high temperature stress on physiological characteristics of rice during heading and flowering period(高温对水稻抽穗扬花期生理特性的影响)[J]. *J Jiangsu Univ(江苏大学学报)*,**31**(2):125-130

Nobuhiro Suzuki,Shin Taketa,Masahiko Ichii. 2003. Morphological and physiological characteristics of a root-hairless mutant in rice(*Oryza sativa*)[J]. *Plant and Soil*,**255**:9-17

Shi GY(石贵玉),Chen MM(陈明娟). 2005. Effects of Cr⁶⁺ and Se on the growth and physiology of rice seedling(铬、硒对水稻幼苗生长和生理的影响)[J]. *Guihaia(广西植物)*,**25**(3):281-284

Wang WD(王卫东),Su MJ(苏明杰),Zhu XL(朱晓蕊). 2007. The effect of ion implantation on the activity of three kinds of protective enzymes in 3rd-leaf period of wheat(离子注入对小麦三叶期 3 种保护酶活性的影响)[J]. *Acta Agric Boreal Sin(华北农学报)*,**22**(1):13-16

Xiao Q(肖强),Chen J(陈娟),Wu FH(吴飞华),*et al.* 2008. Effects of exogenous nitric oxide donor SNP on contents of chlorophyll and free proline, activity of antioxidative enzyme in rice seedlings under NaCl stress(外源 NO 供体硝普钠(SNP)对盐胁迫下水稻幼苗中叶绿素和游离脯氨酸含量以及抗氧化酶的影响)[J]. *Acta Agron Sin(作物学报)*,**34**(10):1 849-1 853

Xu M(许明),Jia DT(贾德涛),Ma DR(马殿荣),*et al.* 2010. Correlation of root physiology and leaf photosynthesis characteristics in northern chinese japonica super rice(北方超级粳稻根系生理、叶片光合性能特点及其相互关系)[J]. *Acta Agron Sin(作物学报)*,**36**(6):1 030-1 036