

植物雌蕊与花粉自交不亲和的研究进展

张雪梅, 李保国, 齐国辉

(河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000)

摘要:就雌蕊自交不亲和的类型、进化, S-RNase 的存在部位、结构及其表达方式, 花粉 S 基因分子基础及其基因功能的预测进行了综述。

关键词:花柱; 花粉; 自交不亲和

中图分类号:Q 944. 44 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)10-0185-03

自交不亲和(Self-incompatibility, 简称 SI)是指能产生具有正常功能且同期成熟的雌雄配子的雌雄同株植物在自花授粉或相同基因型异花授粉时不能受精的现象^[1]。由于 SI 是植物重要生命过程—生殖的一种现象, 对 SI 进行深入研究将在生物生殖学和杂种优势利用等方面具有重要的理论意义和应用价值。现对花柱和花粉自交不亲和基因的存在部位、基因分离、结构及其表达方式等特性作以简要综述。

1 植物自交不亲和现象的普遍性

目前已证实, 自交不亲和广泛存在于显花植物中。据报道, 自然界中已经在 74 科 250 属约 3 000 种以上的显花植物中发现了自交不亲和现象^[2], 还有人估计, 约有一半的被子植物中存在自交不亲和性^[3]。

1.1 雌蕊自交不亲和性的类型及其进化

植物的自交不亲和性(SI)在遗传上受 S 位点复等位基因控制, 按形态学和遗传学的分类方法, 植物的自交不亲和性分为孢子体型 SI(Sporophytic self-compatibility, 简称 SSI)和配子体型 SI(Gametophytic self-incompatibility, 简称 GSI)^[4]。

从进化的角度看, GSI 比 SSI 更原始, SSI 是由 GSI 进化而来的。同一类型的 SI 的遗传控制途径在不同植物间也表现出很大的差异。如罂粟科、十字花科芸苔属、蔷薇科、茄科和玄参科植物均属于 GSI, 但在分子生物学研究中发现, 前 2 种植物的 S 基因没有同源性, 说明 GSI 是多起源通过异源同功进化而来的; 而后 3 种植物的自交不亲和和遗传机制较相似, 说明这 3 种植物配子体 SI 具有相同的起源^[5]。

1.2 雌蕊 S-RNase 的存在部位及其结构

第一作者简介:张雪梅(1980-), 女, 博士, 助理研究员, 现主要从事经济林栽培生理及分子生物学等方面的研究工作。

责任作者:李保国(1958-), 男, 博士, 教授, 现主要从事经济林栽培生理及山区开发技术研究工作。

基金项目:河北省科技支撑计划资助项目(09230602D)。

收稿日期:2011-03-18

1921 年 Perll 肯定了自交不亲和性是由遗传因素决定的^[6], 随着遗传学、免疫学和分子生物学的发展, 表明多数植物 SI 是由单个基因位点上的复等位基因(该位点叫 S 位点, 该位点的基因叫 S 基因)控制^[7]。在 20 世纪 50 年代初期, Lewis 用免疫学方法从配子体自交不亲和植物月见草(*Oenothera organensis*)中找到了与 S 基因位点相关的蛋白质^[8]。20 世纪 80 年代对配子体自交不亲和蛋白质的分离、鉴定、测序、分布部位及本质进行了研究, 分别在 *Prunus aviu*、*Lycopersicon*、*Peruvianum*、*S. tuberosum*、*S. chacoense* 柱头成分中提纯和鉴定了与自交不亲和性连锁的蛋白质。Anderson^[9]、Cornish 等^[10]发现 S-糖蛋白存在于雌蕊输导组织的胞外空间。S-糖蛋白的分子量为 24~32 kDa, 等电点在 6.2~9.5 之间, 不同 S 基因编码的 S-糖蛋白都普遍存在一个长约 20 个氨基酸的引导肽, 但其一级结构的同源性差异从 38%~93%不等。Anderson 等^[11]分离并克隆 cDNA 研究也表明, S-糖蛋白是雌蕊与花粉识别所必须的, 能够降解来自花粉管的 RNA(rRNA 和 mRNA 等), 导致不亲和反应的产生^[12]。

S-RNase 在结构上由保守区和高变区二部分组成。茄科植物 S-RNase 的保守区可划分为 C1~C5 5 个区域。其中 C1、C4、C5 是疏水区, 与 S-RNase 的结构有关; C2、C3 由 2 个组氨酸残基组成的亲水区, 是 S-核酸酶的活性部位。高变区可划分为 HVa(Hypervariable region, 简称 HV)和 HVb 2 个区域, 介于 C2 和 C3 之间, 是 S-糖蛋白中含亲水集团最多的部分^[13-14]。

1.3 雌蕊 S-RNase 的表达

张绍铃等在研究梨品种花柱时发现, 相同 S 基因所表达的糖蛋白量因品种而异的现象主要是由于梨品种花柱内还存在着调控 S 基因表达的修饰基因所致^[15]。随着人们对 SI 研究的不断深入, 发现仅有 S-RNase 是不能决定雌蕊 S 基因表型的。将 S-RNase 转入到同种 SC 植株并使其获得 S 基因特异性花粉拒斥作用, 但当 S-RNase 在 SI 和 SC 植株杂交的 F1 代表达时, 却不可拒斥相应的 S 基因型花粉, 显然存在非 S-RNase 的物质参

与花柱的 SI 反应。通过差异性 cDNA 克隆的方法从烟草花柱中分离到天冬氨酸蛋白 HT, 反义转基因降低该蛋白的表达可使雌蕊接受原本不亲和的花粉^[16]。但关于 HT 的功能还有待于进一步研究。

2 花粉 S 基因的分离

关于花粉 S 基因的研究, 近几年在玄参科、茄科、蔷薇科的某些种上才得到了突破^[17], 发现了一类最有可能成为花粉 S 基因的候选基因 SFB/SLF(S haplotype-specific F-box gene/S-Locus F-box gene), 目前尚未分离鉴定控制花粉不亲和性的 F-box 基因表达产物, 但通过基因结构和表达特点分析, 已经肯定了花粉自交不亲和性是由 F-box 基因控制, 在 F-box 基因中特异控制花粉不亲和性的基因区域确定为花粉自交不亲和基因, 并将其命名为花粉自交不亲和基因或花粉 S 基因(Sp 基因), 该研究的发现为花粉自交不亲和的研究奠定了坚实的基础^[18]。

2.1 花粉 S 基因的分子基础

Lai 等在国际上首次克隆到了 1 个与花粉决定因子相关的基因 AhSLF-S2^[19], 该基因包含 S2-RNase 共 63 kb 的序列, 基因下游 9 kb 处存在编码 F-box 蛋白的 1 个基因 Ah SLF-S2(An-tirrhinum hispuiicum S-locus F-box gene- S2), 仅在花粉绒毡层表达, 极有可能是花粉 S 基因。Zhou 等证明该 Ah SLF-S2 基因具有花粉决定因子的遗传学特征^[20]。Qiao 等将金鱼草的包含 AhSLF-S2 和 AhS2-RNase 的具转化功能的人工染色体(TAC26)转到自交不亲和的矮牵牛中^[21], 发现自交不亲和的花粉蛋白功能的特异性丢失。在花烟草和矮牵牛的某些种上, S 等位基因的复制与自交亲和的花粉部分突变(PPM)有关^[22], 这些突变的花粉基因可以阻止除同源 S-RNase 之外 S-RNase 的表达。

Ushijima 等^[23]在扁桃(*Prunus dulcis*)上通过染色体步移扩增扁桃 Sc 单元型, 构建了围绕 Sc-RNase 基因的约 200 kb 的重叠克隆群, 序列分析表明, 核果类果树的自交不亲和决定基因可能在约 70 kb 的范围内。2003 年应用 RiceGAAS 系统对该 70 kb 的序列分析表明, 在该区域存在 10 个开放读码框(ORFs), 与西班牙金鱼草的 S2 位点类似^[24]。通过对 Sa, Sb, Sc 花粉 cDNA 进行 RACE 得到了扁桃的 SFBa, SFBb, SFBc 序列, 推测的氨基酸序列分析表明, 3 个 SFBs 序列变异范围在 68.4%~76.4%, 与扁桃 S-RNase(54.2%~76.2%)相似^[25]。花粉突变与 SLF/SFB 的切断或缺失有关, 因此更加证明该基因控制蔷薇科植物花粉 S 基因的特异性^[26]。Etani 等^[27]对梅(*Prunus mume*)品种 Nanko S7 单元型的序列分析表明, 该区域存在 4 个编码 F-box 蛋白的基因, 证明 SLF 具有 S 单元型序列多态性, 表达实验也证实仅 SLF 在花粉中专一表达。Yamane 等^[28]采用反向 PCR 的策略获得了 2 个甜樱桃(*Prunus avium*)的 SFB 基因: Pa-SFB3 及 Pa-SFB6, 推测的氨基酸序列表明与扁桃 Pd-

SFB 为同源基因, 并且也表现出了专一序列多态性和花粉中特异表达的特点。

2.2 植物自交不亲和中 SFB/SLF 的定位

Zhou 等^[29]首先建立金鱼草基因组文库, 并对基因组文库进行杂交和测序, 发现花粉 S 基因在基因组中位于雌蕊 S-RNase 的下游区域, 它们大约相距 9 kb。Li 等以茄科自交不亲和植物的雌蕊为材料, 利用泛素抗体的荧光免疫检验法在花粉内壁和花粉管壁上检测到泛素共轭蛋白^[30], Wang 等利用免疫化学和 WESTER 杂交技术对金鱼草的 SLF 蛋白定位进行了研究^[31], 试验表明, 花粉管出现的部位有大量的黄色颗粒, 随着花粉管的伸长, 在花粉管的细胞质及内质网(ER: endoplasmic reticulum)外围发现了抗体结合位点。花粉管萌发 16 h 后仍能检测到 Ah SLF-S2 和可能的其等位基因产物, 表明 SLF 蛋白对花粉管的伸长过程起作用。

2.3 植物自交不亲和中 SFB/SLF 的作用

作为“死亡标签”, 泛素化对于清除废物蛋白及调控细胞通路转化具有重要意义。然而, 近年来不断有证据表明, 泛素化也是蛋白在膜系统间运输的关键环节。F-box 蛋白是泛素连接酶 SCF 复合体的组分^[32], 以 SCF 复合体介导的泛素/26S 蛋白小体蛋白质降解途径是一种十分重要的细胞调节手段。在该途径中, SCF 复合体催化目标蛋白质泛素化的最后一步, F-box 蛋白作为受体, 募集目标蛋白连接核心复合物以泛素化。SFB 的 N 端 F-box 结构与 SCF 复合体的组件 Skp1 连接, 而 C 端则特异结合靶蛋白^[33]。Qiao 等^[34]利用免疫共沉淀和酵母双杂交等技术, 首次证明 Ah SLF-S2 能和 S-RNase 及与 SCF 蛋白降解复合体中的 ASK1、CULLIN 相互作用。并通过特异抑制剂和生化试验, 证明 S-RNase 在亲和组合中被泛素化。Hua 等^[35]在研究矮牵牛(*Petunia inflata*)的 S 位点 F-Box 蛋白和 E3 连接酶复合体时发现: Pi SLF 作为一种典型的 F-Box 蛋白与 Skp1、Cullin-1 和 Rbx1 组成 SCF 复合体调节非自身的 S-RNase 降解, 这与 Qiao 的研究是一致的。

已发现的李属自交亲和的原因均是花粉 S 基因发生了突变而丧失了功能^[36], 而来自甜樱桃的 S4'和 S3'突变体的 SFB 基因缺失 TAAA 暗示 SLF/SFB 的功能丢失导致植物自交不亲和性的丧失。Broothaerts 等^[37]以研究表明, 转基因苹果具有自交亲和性主要是由于花柱 S 蛋白的缺失, 使得花粉管能正常生长。

3 展望

配子体自交不亲和植物中, 含有雌蕊 S 基因型之一的花粉在柱头萌发后, 花粉管在花柱中的生长受到抑制, 不能正常到达子房室完成受精。抑制剂模型认为花柱中由 2 个等位基因产生的 S-RNase 都会进入花粉管, 而花粉 S 基因产物会抑制外源 S-RNase 的作用, 同源的 S-RNase 保留下来最终导致自花花粉管内 RNA 的降解^[38]。花粉特异性表达的 F-box 蛋白基因的发现, 使得

SCF 途径介入配子体自交不亲和反应成为新一轮自交不亲和研究的一个重要起点。SCF 组成之一的花粉 S 基因产物 F-box 蛋白特异性识别异源 S-RNase, 将其标记泛素而降解, 同源 S-RNase 被保留下来, 作为细胞毒素分解自花花粉管内的 RNA^[39]。GSI 反应的机制随着花粉特异性表达的 F-box 基因的发现而得到深入研究, 但是还需要大量实验证明 F-box 基因表达产物可能参与 SCF 复合体与底物蛋白的互作反应。自交不亲和识别过程可能涉及不止一条途径, 而是多种因素共同作用的结果。因此, 需要科研人员的不断努力, 彻底揭开植物自交不亲和性的发生机制。

参考文献

- [1] 孟金陵. 植物生殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] Lewis D. Sexual Incompatibility in Plants[M]. Limited; Edward Arnold, 1979.
- [3] Brewbaker J L. Biology of the angiosperm pollen grain[J]. India J. Genet Plant Breed, 1995, 19:121-133.
- [4] East E M. The distribution of self-sterility in Plants[J]. Proc. Am. Phil. Soc., 1940, 82:449-518.
- [5] Brewbaker J L. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants[J]. Hered, 1957, 48:271-277.
- [6] Prell H. Das Problem der Unfruchtbarkeit[J]. Natere Wochschr, N F, 1921, 20:440-446.
- [7] Sato Y, Kurihara A, Abe K, et al. Mode of self-compatibility inheritance in Japanese pear[J]. Jen. Soc. Hort. Sci., 1988, 2:76-77.
- [8] Lewis D, Crowe L K. Theory of reversible mutation[J]. Nature (London), 1953, 171:561.
- [9] Anderson M A, Cornish E C, Mau S L, et al. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana*[J]. Alata. Nature, 1986, 321:38.
- [10] Cornish E C, Pettitt J M, Boning I, et al. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana*[J]. Alata. Nature, 1987, 326:367.
- [11] Andeoon M A, Cornish E C, Mau S L, et al. Colning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*[J]. Nature, 1986, 321:38-44.
- [12] Kao T H. Gametophytic self-incompatibility a mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction[J]. Plant Phvsiol, 1994, 91:1992-1997.
- [13] McClure B A, Gray J E, Anderson M A, et al. Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA[J]. Nature, 1990, 347:757-760.
- [14] Murfett J, Atherton T L, Mou B. S-RNase expressed in transgenea in *Nicotian* causes S-allele-specific rejection[J]. Nature, 1994, 367:563-566.
- [15] 张绍铃, 杨记曦, 李秀根, 等. 梨自交不亲和强度不同品种花柱 S 糖蛋白含量的差异[J]. 园艺学报, 2002, 29(2):165-167.
- [16] Horiuchi H. Primary structure of abass non-specific ribonuclease from *Rhizopus rureus*[J]. J Brochem, 1988, 103:408-418.
- [17] Kirch H H. Characterization of proteins associated with self-incompatibility in *Solanum tuberosum*[J]. Theor Appl Genet, 1989, 78:581-588.
- [18] Huang S, Lee H S, Karunanandaa B. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S-protein is essential for rejection of self-pollen[J]. Plant Cell, 1994 (6):1021-1028.
- [19] Lai Z, Ma W, Han B, et al. An F-box gene linked to the self-incompatibility (s) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tap-
- teum [J]. Plant Molecullar Biology, 2002, 50:29-42.
- [20] Zhou J, Wang F, Ma W, et al. Structural and transcriptional analysis of S-locus F-box genes in *Antirrhinum*[J]. Sex Plant Reprod, 2003, 16:165-177.
- [21] Qiao H, Wang F, Zhao L, et al. The F-box protein Ah SLF-S2 controls the pollen function of S-RNase-Based Self-Incompatibility [J]. The Plant Cell, 2004, 16:2307-2322.
- [22] Mc Cubin A G, Kao T H. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions[J]. Ann Rer. Cell Dev. Biol, 2000, 16:333-364.
- [23] Ushijima K, Sassa H, Tamura M, et al. Characterization of the S-locus region of almond (*Prunus dulcis*): analysis of somaclonal mutant and a cosmid contig for an S haplotype[J]. Genetics, 2001, 158:397-386.
- [24] Ushijima K, Sassa H, Danelekar A M, et al. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism [J]. Pant Cell, 2003, 15:771-781.
- [25] Golz J F, Su V, Clarke A E, et al. A molecular description of mutations affecting the pollen component of *Nicotiana glauca* S locus[J]. Genetics, 1999, 152:1123-1135.
- [26] Loerger T R, Gohlke I R, Xu B, et al. Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solonrceae[J]. Sex Plant Reprod, 1991(4):81-87.
- [27] Entain T, Iwano M, Shiba H, et al. Comparative analysis of the self-incompatibility(S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity[J]. Gene Cells, 2003(8):203-213.
- [28] Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, et al. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in tow species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium* [J]. Plant cell physical, 2003, 44:764-769.
- [29] Zhou J, Wang F, Ma W, et al. Structural and transcriptional analysis of S-locus F-box genes in *Antirrhinum* [J]. Sex Plant Reprod, 2003, 16:165-177.
- [30] Li Y Q, Southnorth D, Linskens H F, et al. Localization of ubiquitin in anthers and pistils of *Nicotiana*[J]. Sex Plant Reprod, 1995(8):123-128.
- [31] Wang H Y, Xue Y B. Subcellular localization of the S locus F-box protein AhSLF-S2 in pollen and pollen tubes of self-Incompatibility *Antirrhinum*. Plant Biology, 2005, 47(1):76-83.
- [32] Deshaies R J. SCF and Cullin/ring H2-based ubiquitin ligase [J]. Ann Rev Cell Dev Biol, 1999, 15:435-467.
- [33] Bai C, Sen P, Hofman K, et al. Skp1 connects cell cycle regulation to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif the F-box [J]. Cell, 1996, 86:263-274.
- [34] Qiao H, Wang H, Zhang L, et al. The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*[J]. Plant Cell, 2004, 16:582-595.
- [35] Hua Z, Kao T. Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-Locus F-Box-Containing E3 ligase complex in S-RNase-Based-Incompatibility[J]. The Plant Cell, 2006, 18:2531-2553.
- [36] Boskovic R, Tobutt K R, Schmidt H, et al. Re-examination of (in) compatibility genotypes of two John Innes self-compatible sweet cherries elections[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101:234-240.
- [37] Broothaerts W, Keulemans J, van Nerum I. Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing[J]. Plant Cell Rep, 2004, 22:497-501.
- [38] Thompson R D, Kirch H H. The S-locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest[J]. Trends Genet, 1992(8):381-387.
- [39] Weissman A M. Themes and variations on ubiquitylation[J]. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2001(2):169-178.