

沙田柚花柱蛋白对其花粉萌发及生长的影响

覃屏生, 张 瑜, 侯丽霞, 杨孝文, 秦新民

(广西师范大学 生命科学院, 广西 桂林 541004)

摘 要:以沙田柚花粉为试材, 研究比较了自交和异交花柱提取蛋白对花粉萌发和花粉管生长的影响。结果表明: 添加沙田柚自交、异交花柱蛋白后, 花粉的萌发未受影响。但花粉管的生长情况在二者之间有明显差异, 添加异交花柱蛋白对花粉管的生长没有影响, 而添加自交花柱蛋白的花粉管的生长受到明显抑制。PAGE 电泳显示自交花柱蛋白处理的花粉管出现了 1 条特异蛋白带(R_f 值=0.81); SDS-PAGE 电泳检测到自交花柱蛋白处理的花粉管出现了相对分子量为 35.0 kD 和 37.5 kD 的 2 条特异蛋白带; IEF-PAGE 电泳的结果表明, 在自交花柱蛋白处理的花粉管蛋白中出现了等电点为 5.85 和 6.20 的 2 条的特异蛋白谱带。

关键词:沙田柚; 花粉萌发; 花粉管长度; 花柱蛋白; 电泳

中图分类号:S 666.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0088-04

沙田柚(*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.) 原产于广西容县沙田乡, 因其口感好、营养丰富而深受广大消费者欢迎, 是南方果树中较重要的树种之一, 在我国广东省、广西省的栽培面积较大。然而在生产中, 沙田柚存在着严重的自交不亲和现象, 在自然授粉情况下坐果率极低, 产量很少, 通过人工授粉(亲和花粉)虽然能提高坐果率, 但需耗费大量的人力和物力, 增加生产成本。因而研究沙田柚的自交不亲和机理具有重要的生产实践价值和理论意义^[1]。

关于沙田柚配子体自交不亲和现象, 薛妙男等^[2]对沙田柚自交不亲和性的细胞学基础和生化基础进行了一系列较为深入的研究, 确定了沙田柚属于配子体型自交不亲和类型; 花粉管在花柱中的生长途径以及花粉管在花柱的 1/2 部位生长受阻^[3]; 同时, 还用免疫胶体金标技术对花柱 S 糖蛋白进行了组织化学定位^[4]。杨继华等^[5]采用亲和层析和电泳相结合的方法, 分离纯化了沙田柚花柱特异糖蛋白, 并对其生物学活性及生化性质进行了分析。而有关沙田柚花粉的研究报道不多。现已证明植物配子体自交不亲和性受 1 个具有复等位基因的 S-位点控制, S-位点至少包括 2 个基因, 1 个在花柱中特异性表达, 称花柱 S-基因; 另 1 个在花粉中特异表达,

称花粉 S-基因, 自交不亲和的拒斥反应即是花柱 S-基因和花粉 S-基因互作的结果。因此配子体自交不亲和涉及到花粉和花柱中相关基因的表达和相互作用。该试验研究了沙田柚自交和异交花柱蛋白对自身花粉萌发和花粉管生长的影响, 并比较了自交和异交花柱蛋白处理条件下花粉管蛋白的差异, 以期克服沙田柚自交不亲和提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试花粉采自 10 a 生沙田柚结果树。

1.2 试验方法

当天开花的花药置于电热吹风干燥箱中, 25℃ 恒温 2 h, 吹干表面水分, 再置于 25℃ 恒温房中自然晾干至花药完全散开、花药壁翻转, 使花药含水量在 11.8%~15.5% 范围内。

1.2.1 自交、异交花柱蛋白的提取 分别取沙田柚自交、异交(酸柚×沙田柚)后 3 d 花柱, 切取 1/2 花柱段, 参照杨继华等^[6]的方法提取花柱蛋白, 紫外分光光度计测定蛋白质浓度后置于-20℃ 备用。

1.2.2 花粉管的培养与收集 基本培养基在 Brewbaker 等^[7]的基础上加以改良: 15% 蔗糖, 0.02% 硫酸镁, 0.01% 硝酸钾, 0.03% 硝酸钙, 0.01% 硼酸, 20% PEG 4000, pH 5.6, 在培养液中分别加入自交、异交花柱识别蛋白提取物, 并使蛋白质终浓度为 0.5 mg/mL。选择有凹槽的载玻片进行花粉培养, 把配制好的液体培养基滴在载玻片的凹槽内, 每个凹面皿加 1.5 mL 培养液, 然后用毛笔均匀撒播适量花粉, 再将载玻片放在垫有湿滤纸的培养皿中, 加盖后置于 28℃ 恒温箱内培养, 每个处理重复 3 次。培养 24 h 后, 检测花粉的萌发及花粉管生

第一作者简介:覃屏生(1976-), 男, 广西环江人, 硕士, 讲师, 现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail: qps@mailbox.gxnu.edu.cn.

责任作者:秦新民(1956-), 男, 广西灵川人, 教授, 现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail: xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31360477); 广西科技厅科研资助项目(2013YB036)。

收稿日期:2013-10-30

长状况。同时,将培养好的 2 种花粉管(即分别添加自交、异交花柱蛋白培养的沙田柚花粉管)培养液分别装入 50 mL 离心管中,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用蒸馏水清洗 3 次,吸干水分后置-20℃冰箱中备用。

1.2.3 花粉管蛋白的提取 自交和异交花柱处理后的花粉管收集后,按文献[6]的方法提取花粉管蛋白。

1.2.4 花粉管蛋白的电泳 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)参考文献[8]方法进行。浓缩胶 4%,分离胶 10%,电极缓冲液系统为 Tris-甘氨酸(pH 8.3),浓缩胶恒压 70 V,分离胶恒压 150 V 至电泳结束。取出凝胶板,进行考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色 30 min,脱色至背景清晰,拍照、保存。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)参考文献[8]方法进行。浓缩胶 4%,分离胶 10%,电极缓冲液系统为 Tris-甘氨酸(pH 8.3),含 0.1% SDS,浓缩胶恒压 70 V,分离胶恒压 150 V 至电泳结束。取出凝胶板,进行考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色 180 min,脱色至背景清晰,拍照、保存。载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦(IEF-PAGE)参考 Vesterberg^[9] 和郭尧君^[8] 等方法进行。预电泳为 200 V 10 min,300 V 30 min,400 V 30 min。预电泳结束,小心吸取胶面上液体,每管上样 15 μL(其中有 2 管为空白对照,用来测 pH 值),再依次加入 20 μL 样品覆盖液防止样品与电极液直接接触,覆盖液上加满负极液。电极液为:上槽(负极)0.02 mol/L NaOH,下槽(正极)0.01 mol/L H₃PO₄,在室温下,按 400 V 1 h,600 V 12 h,800 V 1 h 的程序进行聚焦电泳。

2 结果与分析

2.1 花柱蛋白提取液对花粉萌发的影响

花粉培养 24 h 后进行镜检,每个培养皿随机观察 30 个视野。以花粉管长度等于或大于花粉粒直径(1/2)以上者为萌发标准^[10-11],统计花粉萌发率。结果表明,花粉在含自交花柱蛋白的培养基中的萌发率为 80.1%,而在含异交花柱蛋白的培养基中花粉萌发率为 81.6%,在不添加任何花柱蛋白的培养基中,花粉的萌发率为 83.0%。三者之间差异不大。

2.2 花柱蛋白提取液对花粉管生长的影响

不同浓度的自交花柱蛋白对花粉管生长均有抑制作用,当自花授粉花柱蛋白达到 0.5 mg/mL 时,其抑制作用明显。花粉在分别添加 0.5 mg/mL 自交和异交花柱蛋白的培养基中,每隔 2 h 对花粉管的生长情况观察 1 次。结果发现,在添加自交花柱蛋白的培养基中,花粉管的生长从培养的 4 h 开始受到抑制,4~10 h 内发生明显的抑制作用,10 h 后花粉管不再继续生长,其平均长度(240.1 μm)仅为添加异交蛋白花粉管平均长度(728.0 μm)的 1/3 左右;添加异交蛋白培养液中的花粉管平均长度与未添加任何花柱蛋白的花粉管的平均长度相比(736.2 μm),在生长状况上没有明显差异。

2.3 PAGE 电泳结果

添加自交、异交花柱蛋白培养的花粉管可溶性蛋白

经 PAGE 电泳分离结果显示,2 种花粉管可溶性蛋白图谱所显示蛋白条带比较均匀,分布差异不明显,仅在 R_f 值=0.81(比移 R_f =条带泳动距离/指示剂泳动距离)处,自交花柱蛋白处理的花粉管的蛋白图谱显示出 1 条特异蛋白带(图 1 箭头 a 所示)。

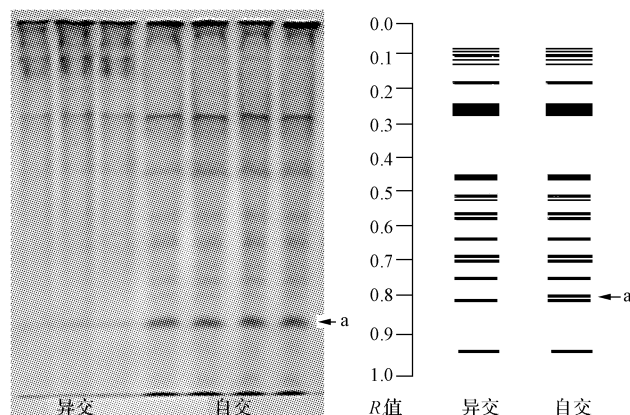


图 1 自交、异交花粉管蛋白的 PAGE 电泳结果与模式

Fig. 1 PAGE electrophoresis pattern of proteins from self-pollinated and cross-pollinated pollen tube

2.4 SDS-PAGE 电泳结果

分别添加自交、异交花柱蛋白培养的 2 种沙田柚花粉管可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果显示,各种蛋白分子量集中在 100 kD 内,在每条泳道高、中、低分子量区域比较均匀地分布了约 50 条蛋白带,蛋白条带数目明显地比普通电泳即 PAGE 电泳结果(图 1)增加,这说明构成花粉管可溶性蛋白的亚基种类较多。2 种花粉管可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱基本相似,仅在自交柱蛋白处理的花粉管可溶性蛋白图谱中发现 2 条相对分子量分别约为 35.0 kD 和 37.5 kD 的蛋白特异带(图 2 箭头 a、b 所示),在异交柱蛋白处理的花粉管可溶性蛋白提取物中未发现蛋白特异带。

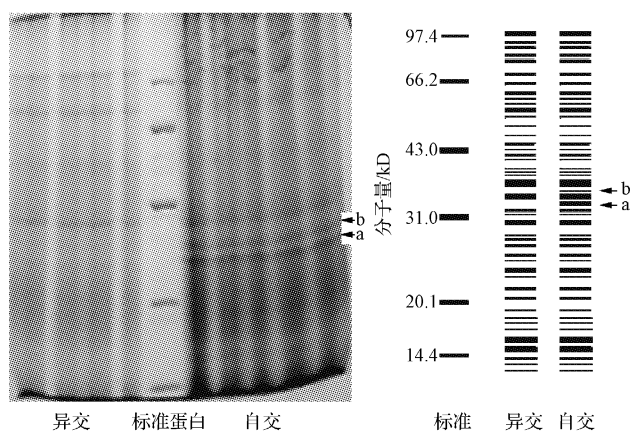


图 2 自交、异交花粉管蛋白 SDS-PAGE 电泳结果与模式

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis pattern of proteins from self-pollinated and cross-pollinated pollen tube

2.5 IEF-PAGE 电泳结果

分别添加自交、异交花柱蛋白培养的 2 种花粉管可溶性蛋白等电聚焦电泳分离结果显示,蛋白质等电点主要集中在 pH 4.5~7.8;2 种处理方式花粉管蛋白电泳图谱差异不大,但在自交花粉管蛋白的电泳图谱上发现了 2 条特异蛋白带,等电点分别为 6.20 和 5.85(图 3 中 a、b)。

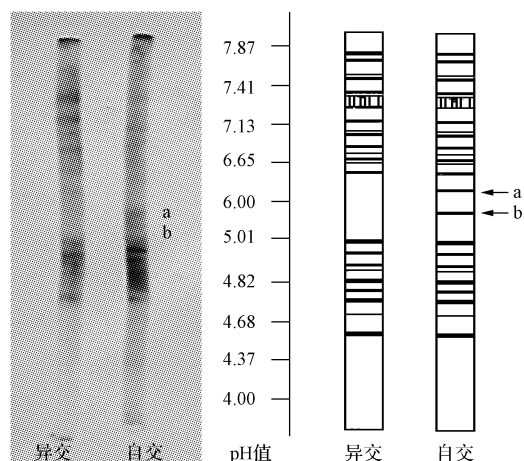


图 3 自交、异交花粉管蛋白 IEF-PAGE 电泳结果与模式
Fig. 3 IEF-PAGE electrophoresis pattern of proteins from self-pollinated and cross-pollinated pollen tube

3 讨论

薛妙男等^[1-3]对沙田柚自花授粉和异花授粉(沙田柚×酸柚)过程中,花粉的萌发、花粉管的生长,以及受精过程进行了研究,发现无论是自花授粉还是异花授粉,花粉在柱头上均能萌发,并且花粉管能通过柱头乳突细胞间隙进入柱头。但自花授粉和异花授粉的花粉管在柱头中的生长情况完全不同,自花授粉的花粉管伸长到花柱 1/4~1/2 时,自、异交的花粉管生长速度出现差异,自交花粉管在花柱 1/2 左右处停止生长,而异交花粉管生长正常进入胚囊受精。至于自、异交花粉管在花柱中的这种生长差异的原因,杨继华等^[12]认为沙田柚花柱在自花授粉后诱导能够产生具有核酸酶活性的 S-糖蛋白,这种 S-糖蛋白可对花粉管的生长产生抑制作用,而在异花授粉的花柱中没有发现 S-糖蛋白的产生。这种现象在烟草^[13-14]、矮牵牛^[15]、秘鲁番茄^[16]和苹果^[17]等植物中也有报道。该试验在沙田柚花粉的离体萌发过程中,通过添加自交和异交花柱蛋白,发现沙田柚花粉的萌发没有受到影响,但在随后花粉管的生长中,自交花柱蛋白对花粉管的生长有明显抑制作用,培养 4 h 开始花粉管的生长速度降低,10 h 后不再生长,24 h 时

其长度仅为添加异交花柱蛋白花粉管的 1/3。结果与沙田柚栽培条件下自交、异交时花粉的萌发和花粉管的生长情况相吻合。

通过对自交、异交花柱蛋白处理的沙田柚花粉管可溶性蛋白质进行电泳分析比较,发现在添加了自交花柱蛋白的花粉管中出现了一些特异蛋白质,特异蛋白亚基分子量分别大约为 35.0 kD 和 37.5 kD,特异蛋白的等电点分别为 5.85 和 6.20。但其理化特性、生活学活性、与花柱 S-核酸酶的相互作用,以及在自交不亲和中的作用等还有待今后进一步深入细致的研究。

参考文献

- [1] 薛妙男,陈腾土,杨继华. 沙田柚自交和异交亲和性观察[J]. 园艺学报,1995,22(2):127-132.
- [2] 薛妙男,杨继华,张杏辉. 沙田柚自交不亲和性结构基础研究[J]. 植物学通报,1996,13(专):87-88.
- [3] 薛妙男,杨继华. 沙田柚花粉管在花柱中的生长途径及其识别[J]. 广西师范大学学报(自然科学版),2001,19(2):60-66.
- [4] 薛妙男,李义平,张杏辉,等. 沙田柚自交花柱 S₁-RNase 的免疫胶体金定位[J]. 广西师范大学学报(自然科学版),2000,18(1):81-84.
- [5] 杨继华,尧桂荣,薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白的纯化和 N-端序列测定[J]. 广西师范大学学报(自然科学版),2001,19(1):72-79.
- [6] 杨继华,颜承,薛妙男,等. 沙田柚花粉蛋白质双向电泳分析[J]. 广西师范大学学报(自然科学版),2002,20(2):73-77.
- [7] Brewbaker J L, Kwack B H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth[J]. Am J Bot, 1963, 50:859-865.
- [8] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,2005:42-157.
- [9] Vesterbery O. Isoelectric focusing of protein[J]. Methods in Enzymology, 1971(22):389-412.
- [10] 向旭,欧喜良,邱燕萍,等. 影响荔枝花粉活力的化学因子研究[J]. 广东农业科学,2000(6):29-32.
- [11] Vaknin Y, Eisikowitch D. Effects of short-term storage on germinability of pistachio pollen[J]. Plant Breeding, 2000, 119(4):347-350.
- [12] 杨继华,李红艳,薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白的分离与鉴定[J]. 广西师范大学学报(自然科学版),2000,18(4):66-70.
- [13] Anderson M A, Cornish E C, Mau S L, et al. Cloning of a cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca* [J]. Nature, 1986, 321:38-44.
- [14] Bredemeijer G M M, Blass J. S-specific proteins in style of self-incompatible *Nicotiana glauca* [J]. Theor Appl Genet, 1981, 59:185-190.
- [15] Huang S, Lee H S, Karunanandaa B, et al. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S-proteins is essential for rejection of self-pollen[J]. Plant Cell, 1994(6):1021-1028.
- [16] Royo J, Kuntz C, Koyama Y, et al. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:6511-6514.
- [17] Certal A C, Sanchez A M, Kokko H, et al. S-RNases in apple are expressed in the pistil along the pollen tube growth path[J]. Sexual Plant Reproduction, 1999, 12(2):94-98.

Effect of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort. Style Protein on Its Pollen Germination and Growth

QIN Ping-sheng, ZHANG Yu, HOU Li-xia, YANG Xiao-wen, QIN Xin-min
(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

两个苹果 RNA 解旋酶基因的基本特征与表达分析

许瑞瑞¹, 张世忠², 曹 慧¹, 刘慧莲¹, 王建波¹

(1. 潍坊学院, 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室, 山东 潍坊 261061;

2. 山东农业大学 国家苹果工程技术研究中心, 山东 泰安 271018)

摘 要:利用生物信息学方法对 2 个苹果 RNA 解旋酶基因染色体定位、系统进化关系和氨基酸序列基本特征等进行了预测, 分析了基因在果实成熟期和砧穗互作中的表达差异; 利用 PlantCARE 软件对二者的启动子序列中所包含的响应元件进行了预测和分析; 利用 qRT-PCR 方法分析了 2 个苹果 RNA 解旋酶基因的组织表达模式。结果表明:“金冠”苹果基因组中鉴定了 2 个 RNA 解旋酶基因, 命名为 *Mdhelicase1*、*Mdhelicase2*, 分别分布在苹果第 6、17 条染色体上; 表达谱芯片分析发现, 在苹果果实成熟时期和砧木接穗互作过程中, *Mdhelicase1* 和 *Mdhelicase2* 基因的表达有不同程度的变化; 2 个基因的启动子区域存在多个胁迫响应元件, 如 MBS、HSEs、TC-rich repeat、AREs、ABREs、GARE motif、P box、CGTCA motif、TGACE motif、Light responsive elements 等。*Mdhelicase1*、*Mdhelicase2* 在“平邑甜茶”茎、叶、花、果实中都有表达, 二者分别在茎和叶中的表达量最高。

关键词:苹果; RNA 解旋酶; 基因特征; 启动子序列分析; 表达分析

中图分类号:S 661.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0091-06

RNA 解旋酶是一类参与 RNA 结构调控并影响 RNA 合成、复制、翻译起始、剪接、rRNA 加工、核糖体组装、核 mRNA 输出及 mRNA 稳定化与降解的蛋白质新家族^[1-2]。植物细胞中 RNA 解旋酶参与多种代谢过程, 具有广泛的生理意义并且对逆境的适应具有重要作用^[3]。植物中的 RNA 解旋酶已成为该领域的研究热

点, 越来越多的植物基因组中的 RNA 解旋酶基因被克隆鉴定, 包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[4-8]、水稻 (*Oryza sativa*)^[9]、大麦 (*Hordeum vulgare*)^[10]、烟草 (*Nicotiana tabacum*)^[11] 等。

2001 年, Seki 等^[4]在拟南芥中, 通过对 1 300 个基因的 cDNA 进行微阵列 (Microarray) 分析技术, 首次发现冷害诱导型 DEAD-box 解旋酶基因 AB050574, 这一发现表明解旋酶在植物胁迫应答过程中具有一定的作用, 研究还发现拟南芥的 FL25A4 基因能够忍耐 4℃ 的低温; Gong 等^[5]利用图位克隆的方法从有较强的耐寒能力的拟南芥突变体中得到 CRYOPHYTE/LOS4 基因, 试验结果显示该基因编码定位于核膜上的 DEAD-box RNA 解旋酶, 对于 mRNA 的输出和植株的生长发育以及逆境响应具有重要的作用; 大麦中的 RNA 解旋酶基

第一作者简介:许瑞瑞(1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为植物逆境基因表达调控。E-mail: xuruirui2006@163.com.

责任作者:曹慧(1966-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为果树逆境生理。E-mail: hui5232@163.com.

基金项目:山东省自然科学基金资助项目 (Y2007D60); 潍坊市科学技术发展计划资助项目 (20121305, 2012098); 生物化学与分子生物学山东省高校重点实验室 (潍坊学院) 开放课题资助项目 (2012SWKF01)。

收稿日期:2013-10-22

Abstract: Taking the pollen of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort. as material, effect of the self-pollinated style proteins and the cross-pollinated style proteins on pollen germination and pollen tube growth were compared. The results showed that pollen germination was unaffected by adding self-pollinated style protein and the cross-pollinated style protein, but significantly affected the growth of pollen tube. The growth of pollen tube in those media with the self-pollinated style proteins was restrained, with cross-pollinated style proteins was unaffected. PAGE electrophoresis showed that the pollen tube self style protein processing of the 1 specific protein bands ($Rf=0.81$); tube SDS-PAGE electrophoresis to self styleprotein processing appeared relative molecular weight of 2 specific protein of 35 kD and 37.5 kD band; IEF-PAGE electrophoresis results showed that, in the self style protein treated pollen tube protein in the isoelectric points of 5.85 and 6.20 of the two specificprotein bands.

Key words: *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort. ; pollen germination; pollen tube length; style proteins; Gel electrophoresis