

梨内源与外源核糖核酸酶对花粉萌发及花粉管生长的影响

张绍铃, 徐义流, 陈迪新, 徐国华, 赵彩平

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 将从沙梨 (*Pyrus pyrifolia*) 花柱中分离出的 RNase (内源 RNase) 和外源 RNase 添加于花粉萌发培养基培养二十世纪梨花粉。结果表明, 低活性量 (0.006 U) 的 RNase 对花粉萌发及花粉管生长的抑制作用弱; 较高活性量 (0.010 U) 的 RNase T₁ 对花粉萌发及花粉管生长的抑制作用最强, 其次为二十世纪花柱 S-RNase 和 RNase A; 新水花柱 S-RNase 对花粉管生长抑制作用最弱; 在添加这 4 种 RNase 的培养基中, 二十世纪花粉管生长的长度分别是对照花粉管长度 (410 μm) 的 37%、40%、77% 和 79%。不含 S-RNase 的花柱 RNase 虽然活性较高, 但对自花花粉的萌发及花粉管生长没有抑制作用。

关键词: 梨; 内源 RNase; 外源 RNase; 花粉萌发; 花粉管生长

Effects of Styler RNase and Exogenous RNase on Pollen Germination and Tube Growth in Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai)

ZHANG Shao-ling, XU Yi-liu, CHEN Di-xin, XU Guo-hua, ZHAO Cai-ping

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: The results of Nijisseiki (*Pyrus pyrifolia*) pollen cultivation *in vitro* by adding styler RNase or exogenous RNase to the basal medium showed that when the activity of RNase was relatively weak (0.006 U), the inhibitory effect on pollen germination and tube growth was also relatively weak. When the activity of RNase was relatively strong (0.010 U), the inhibitory effect of RNase T₁ on pollen germination and tube growth was the strongest, followed by Nijisseiki styler S-RNase and RNase A, and Shinsui styler S-RNase showed the weakest inhibitory effect on pollen tube growth. The lengths of Nijisseiki pollen tubes cultivated by adding RNase T₁, Nijisseiki styler S-RNase, RNase A and Shinsui styler S-RNase separately to their media were 37%, 40%, 77% and 79% of the control length which was (410 μm), respectively. Although styler RNase without S-RNase had intensified RNase activity, it did not have any effect on self-pollen germination and tube growth.

Key words: Pear; S-RNase; Exogenous RNase; Pollen germination; Pollen tube growth

梨是配子体型自交不亲和性 (GSI) 果树, 自花授粉后, 花粉管在沿花柱向子房生长途中受到抑制而停止生长, 因而无法完成授精、结实过程^[1, 2]。梨自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 是由自交不亲和基因 (S 基因) 控制的。迄今已鉴定出梨雌蕊 S₁~S₇ 的 7 个 S 基因及其所表达产物 S 糖蛋白, 因其具有核糖核酸酶活性, 而被称为 S 核糖核酸酶 (S-RNase)^[3~5]。近年从花柱中分离纯化出了

这种特异性 S-RNase, 经对其生化特性分析表明, 花柱 S-RNase 是一种碱性蛋白, 等电点 (pI) 为 9.3~10.0, 分子量约为 30 kD^[6]。梨花柱 S-RNase 与外源 RNaseA、RNase T₁ 等的 N 端氨基酸序列有高度的同源性^[7]。已有研究证实, 花柱 S-RNase 就是抑制自花花粉管生长的特异性物质, 而且只有当 S-RNase 达到一定含量时才能对花粉管产生抑制作用^[6]。但花柱 S-RNase、RNase 及外源 RNase 对花

收稿日期: 2003-05-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170651, 30270926), 高校博士点专项科研基金资助项目 (2001307012), 江苏省高技术资助项目 (BG2002310) 和国家“863”计划资助项目 (2002AA241191)

作者简介: 张绍铃 (1961-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事果树生殖生理及种质创新研究。Tel: 025-84396580; Fax: 025-84396266; E-mail: nnzsl@sina.com.cn

粉管生长的影响有何异同, 少有报道。本研究将不同品种花柱 S-RNase、花柱 RNase (不含 S-RNase 的花柱 RNase) 及外源 RNase 添加于培养基培养花粉, 探讨了内源 RNase 与外源 RNase 在离体条件下对花粉萌发及花粉管生长的影响。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

试材采自江苏省高邮市果树实验场及溧水县傅家边林果场的成龄结果梨树。选择 SI 强度强的沙梨品种新水 (S 基因型为 S_4S_5) 和 SI 强度弱的品种二十世纪 (S_2S_4) 为试材。2 个品种有 1 个 S 基因不同, 相互授粉能亲和^[2]。采集开花前 1~2 d 的花蕾, 切取花柱称重后贮存于液氮中。收集二十世纪花药, 在室温下干燥, 散出花粉后贮于 -20°C 冰箱中。

1.2 花柱内源 RNase 的分离及纯化

参照 Hiratsuka 等^[6]的方法, 从梨花柱中分离纯化花柱 S-RNase 及花柱 RNase, 统称为内源 RNase, 回收的内源 RNase 经平衡透析后贮于 -80°C 冰箱中。

1.3 内源 RNase 的定量与纯度检测

内源 RNase 的定量参照 Bradford 的方法^[8]。花柱 S-RNase 纯度的检测参照 Hiratsuka 等^[6]的方法。

1.4 内源 RNase 活性测定

参照 Brown 等^[9]的方法, 作部分修改: 取 2 μg 内源 RNase, 加入 100 μl 琥珀酸铵缓冲液及 4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 酵母 RNA 100 μl , 在 55°C 水浴锅内保温 30 min 后, 加入 20 μl 醋酸铀溶液, 离心分离后取上清液, 用分光光度计测定 OD_{260} 值, 并换算成核糖核酸酶的比活性。设定活性单位 $U=1A_{260}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 比活性为 $U\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

1.5 外源 RNase 的配制

外源 RNase A、RNase T_1 均为 Sigma 公司产品, 购回后保存于 -20°C 冰箱中, 使用前测定其对酵母 RNA 的 RNase 比活性, 方法同 1.4。用 MES 缓冲液将其稀释至所需活性单位。

1.6 试验处理及花粉培养

花粉萌发培养基为: 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MES 缓冲溶液 (pH 6.5) 内含 10% 蔗糖、15% PEG-4000、0.01% 硼酸、0.03% 硝酸钙、0.02% 硫酸镁、0.01% 硝酸钾。依比活性大小, 用新水及二十世纪花柱 S-RNase、二十世纪花柱 RNase、RNase A 和 RNase T_1 将培养基内 RNase 活性量分别调整为 0.006 U、0.010 U; 按蛋白质的量将培养基内各个蛋白质的浓度调整为 $0.6\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 。花粉液体培养参照 Hiratsuka 等^[6]的方法进行, 花粉在 25°C 黑暗条件下培养 24 h 后, 将花粉洗落到事先滴有数滴苯胺蓝染色液的载玻片上, 在显微镜下调查花粉萌发及花粉管生长情况, 每个处理重复 4 次, 每个重复调查花粉粒 100 粒, 花粉管 20 条, 取各重复平均值。

2 结果与分析

2.1 梨花柱 S-RNase 与花柱 RNase 活性的差异

以酵母 RNA 为底物, 测定 2 个供试品种花柱 S-RNase 及花柱 RNase (不含 S-RNase 的花柱 RNase) 的比活性。结果表明, 供试梨品种花柱 S-RNase 的比活性, 二十世纪为 $9.05\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 新水为 $8.99\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$; 花柱 RNase 的比活性, 二十世纪为 $27.65\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 新水为 $27.24\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 可以看出, 花柱 RNase 是花柱 S-RNase 的 3 倍左右, 但这 2 个品种内源 RNase 的比活性之间没有显著差异 (表 1)。依据笔者以前调查的梨品种花柱的平均重量^[10]、花柱 S-RNase 含量^[4]以及本试验测定的 RNase 比活性, 可以推算出每根花柱的 S-RNase、RNase 量及活性量 (表 1)。每根花柱 S-RNase 的活性量因品种自交不亲和性强度不同而异, 自交不亲和性强度强的品种新水比自交不亲和性强度弱的品种二十世纪约高 25%。

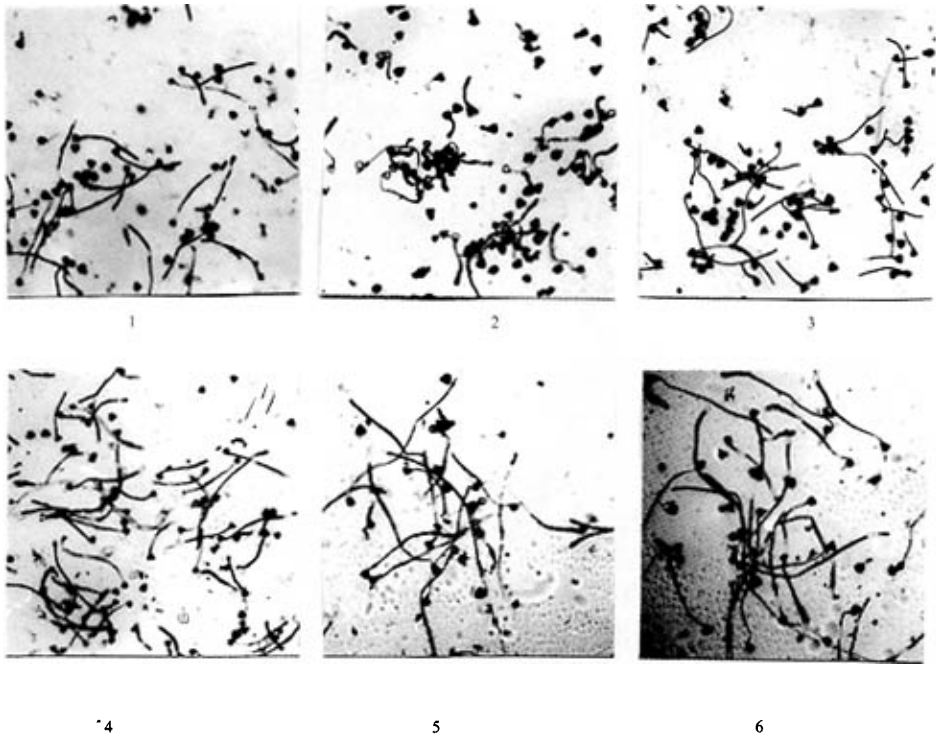
2.2 内源与外源 RNase 对花粉萌发及花粉管生长的影响

在添加不同种类 RNase 的花粉萌发培养基上, 梨花粉萌发及花粉管生长状况不同 (图 1、2、3)。不

表 1 梨花柱 RNase 含量及其比活性的品种间差异

Table 1 The difference of RNase content per style and RNase specific activity between Shinsui and Nijisseiki

品种 Cultivar	核糖核酸酶 RNase	RNase 比活性 RNase specific activity ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	每根花柱 RNase 含量 RNase content per style ($\text{ng}\cdot\text{style}^{-1}$)	每根花柱 RNase 活性 RNase activity per style ($\text{U}\cdot\text{style}^{-1}$)
新水 Shinsui	S_4+S_5 -RNase	8.99 ± 0.19	26.2	2.5×10^{-4}
二十世纪 Nijisseiki	S_2+S_4 -RNase	9.05 ± 0.12	19.8	1.9×10^{-4}
新水 Shinsui	Stylar RNase	27.24 ± 1.22	11.9×10^3	0.35
二十世纪 Nijisseiki	Stylar RNase	27.65 ± 0.61	11.7×10^3	0.34



1. RNase A; 2. RNase T₁; 3. 二十世纪花柱 S-RNase; 4. 新水花柱 S-RNase; 5. 花柱 RNase (不含 S-RNase 的花柱 RNase); 6. 对照 (不含任何蛋白的液体培养基)。下同
 1. RNase A; 2. RNase T₁; 3. S-RNase from Nijisseiki; 4. S-RNase from Shinsui; 5. Stylar RNase without S-RNase; 6. Control (Liquid medium without any protein). The same as below

图 1 几种 RNase 培养基上二十世纪花粉萌发及花粉管生长的差异 (RNase 的活性为 0.010 U·μl⁻¹)

Fig. 1 Variation of Nijisseiki pollen germination and tube growth on several RNase media (The RNase activity was 0.010 U·μl⁻¹)

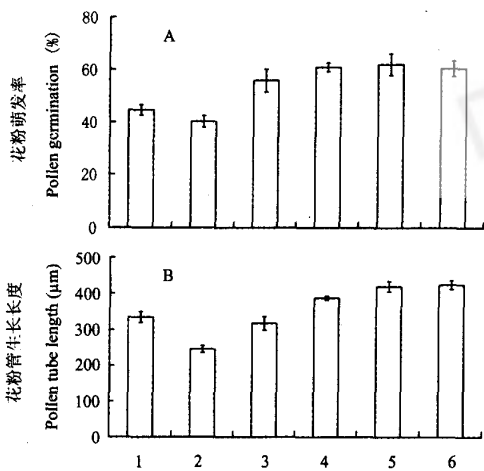


图 2 几种低活性 RNase 对二十世纪花粉萌发 (A) 及花粉管生长 (B) 的影响 (RNase 的活性为 0.006 U·μl⁻¹)

Fig. 2 Effect of several RNases on Nijisseiki pollen germination (A) and tube growth (B) (The RNase activity was 0.006 U·μl⁻¹)

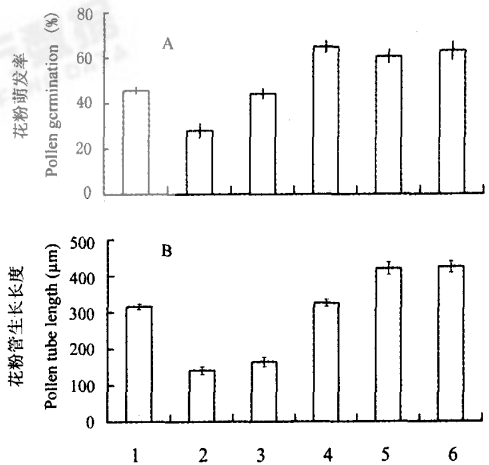


图 3 几种高活性 RNase 对二十世纪花粉萌发 (A) 及花粉管生长 (B) 的影响 (RNase 的活性为 0.010 U·μl⁻¹)

Fig. 3 Effect of several RNases on Nijisseiki pollen germination (A) and tube growth (B) (The RNase activity was 0.010 U·μl⁻¹)

同种类的RNase对二十世纪花粉萌发及花粉管生长的影响不同,同时也受RNase比活性高低影响。

2.2.1 低活性量RNase对二十世纪花粉萌发及花粉管生长的影响 培养基中添加低活性量RNase(0.006 U)时,内源RNase几乎不影响花粉的萌发,而外源RNase T₁与RNase A对花粉萌发有一定的抑制作用,在添加RNase T₁的培养基上,花粉萌发率从对照的60%下降到38%(图2A)。不同种类的RNase对二十世纪花粉管生长的影响与上述情况有所不同,除花柱RNase外,供试的几种RNase均对花粉管生长有一定抑制作用,抑制程度依次为RNase T₁>二十世纪花柱S-RNase>RNase A>新水花柱S-RNase,尤其是RNase T₁对花粉管生长有很强的抑制作用。需要指出的是,在添加新水花柱S-RNase的培养基中培养二十世纪花粉时,其花粉管生长也受轻微抑制,平均长度比对照短37 μm。而二十世纪花柱S-RNase对二十世纪花粉(自花授粉不亲和)有较强的抑制作用,其花粉管长度为对照的75%左右(图2B)。

2.2.2 高活性量RNase对二十世纪花粉萌发及花粉管生长的影响 在较高活性量RNase(0.010 U)的培养基内,RNase对花粉萌发和花粉管生长的抑制作用也因RNase的种类不同而异(图3)。外源RNase T₁对二十世纪花粉萌发的抑制作用最强,花粉的萌发率从对照的61%下降到26%,而在添加二十世纪花柱S-RNase和RNase A的培养基内,花粉萌发率相似,约为43%,添加新水(与二十世纪杂交授粉亲和)花柱S-RNase以及二十世纪花柱RNase时均不影响花粉的萌发(图3A)。高活性量RNase对二十世纪花粉管生长的抑制作用与花粉萌发的稍有差异,其中RNase T₁和二十世纪花柱S-RNase(自花授粉不亲和)对花粉管生长的抑制作用最强,其次为RNase A及新水花柱S-RNase;在添加了这4种RNase的培养基内,二十世纪花粉管生长的长度分别为152、165、316和325 μm,分别是对照花粉管长度(410 μm)的37%、40%、77%和79%(图3B)。该结果表明,在较高活性量的RNase培养基内,内源与外源RNase均能抑制花粉管生长,只不过抑制程度不同而已。同时,内源RNase对花粉萌发及花粉管生长的抑制作用与品种有关,二十世纪花柱S-RNase对自花花粉管生长有强烈的抑制作用,而新水花柱S-RNase对二十世纪花粉管生长的抑制作用较弱;二十世纪花柱RNase对自花花粉

萌发及花粉管生长没有影响。

2.2.3 同一浓度的内源与外源RNase对二十世纪花粉萌发及花粉管生长影响的差异 将供试的各种RNase以蛋白质的量为单位添加到培养基中进行花粉培养(表2),当RNase浓度为0.6 μg·μl⁻¹时,二十世纪花粉的萌发和花粉管生长被外源RNase T₁完全抑制,花粉萌发率和花粉管生长长度均为零;外源RNase A和二十世纪花柱S-RNase对花粉萌发和花粉管生长有轻微的抑制作用,而新水花柱S-RNase对二十世纪花粉萌发及花粉管生长没有抑制作用。

表2 几种RNase对二十世纪花粉萌发及花粉管生长的影响¹⁾
Table 2 Effect of several RNase on Nijisseiki pollen germination and tube growth

RNase种类 RNase type	花粉萌发率 Pollen germination(%)	花粉管生长长度 Pollen tube length (μm)
RNase A	45±4.8	302±9.9
RNase T ₁	0±0	0±0
二十世纪花柱S-RNase	57±1.5	366±18
S-RNase from Nijisseiki		
新水花柱S-RNase	62±5.3	410±15
S-RNase from Shinsui		
不含S-RNase花柱RNase	62±5.3	410±7.9
Stylar RNase without S-RNase		
对照(不含任何蛋白质的培养基)	62±5.0	424±12
Liquid medium without protein		

¹⁾ 培养基中添加的RNase浓度以蛋白质质量计算为0.6 μg·μl⁻¹,表中数值为平均数±标准误

The concentration of the RNase in their medium is 0.6 μg·μl⁻¹;
The data in the table is average ± standard error

3 讨论

笔者应用花柱半离体培养法^[2]、同位素标记花粉^[11]和花粉管荧光染色方法(另文发表),研究了活体花柱内自花和异花花粉管生长的特性。结果均表明,花柱内异花花粉管生长速度快,而自花花粉管生长慢,且在花柱中部左右被抑制而停长;同时,花柱内自花花粉管生长速度也因品种不同而异,自交不亲和性强的品种新水的自花花粉管生长速度比弱的品种二十世纪的慢,停止生长也早。本研究表明,该2品种花柱内S-RNase的比活性差异不明显,但每根花柱所含的RNase活性量不同,新水显著高于二十世纪(表1)。这是新水花柱内自花花粉管生长比二十世纪的自花花粉管生长慢的原因所在。在离体花粉萌发培养基内,花粉萌发与花粉管生长取决于花粉管周围的S-RNase量,单花粉管周围的RNase活性量较低时,因达不到抑制花粉萌发及花粉管生长所需的

RNase 活性量, 而对其抑制作用较弱或不起作用 (图2), 该结果进一步验证了梨品种花柱内花粉管生长程度取决于花柱内 S-RNase 含量的观点^[10]。

梨花柱 S-RNase 和外源 RNase T_1 、RNase A 均能抑制花粉萌发和花粉管生长, 对花粉萌发及花粉管生长的抑制作用不仅因 RNase 的种类不同而异, 且抑制程度随 RNase 浓度增高而增强。同时, 内源 S-RNase 是有选择地抑制自花花粉萌发和花粉管生长, 表现为特异性的抑制作用。不含 S-RNase 的花柱 RNase 虽有很强的 RNase 活性 (表 1), 但不能抑制花粉的萌发和花粉管生长 (图 1~3)。外源 RNase 对梨花粉萌发和花粉管生长的抑制作用不存在特异性, 抑制程度完全取决于 RNase 的活性量。虽然外源 RNase B_1 能抑制花粉管生长的事实上已有报道, 但尚不清楚其作用机制^[12], 现有的研究结果尚无法阐明产生上述现象的原因。笔者认为, 可能是由于梨花柱 S-RNase 与外源 RNase A 和 RNase T_1 的 N 末端氨基酸序列有较高的同源性, 三维空间结构也可能相近^[7], 使花粉管膜受体错误地将这些外源 RNase 转移到花粉管内而分解了 RNA, 抑制花粉管生长。另一方面, 笔者用等电聚焦电泳法分析花柱 RNase 的结果表明, 花柱 RNase 主要是等电点 (pI) 为 4.0~5.5 的酸性蛋白^[4], 与花柱 S-RNase (等电点为 9.3~10.0) 存在显著差异, 这可能与不能抑制自花花粉的萌发和花粉管的生长有关。综上所述, 不同种类的 RNase 对梨花粉萌发及花粉管生长的影响各异, 抑制自花花粉管生长的 RNase 必须达到一定浓度且具有 RNase 活性, 但并非具有 RNase 活性的物质均能抑制花粉管生长, 且花柱 S-RNase 仅能抑制自花花粉管的生长, 具有高特异性。

本研究用添加内源及外源 RNase 于培养基培养花粉的方法来观测花粉萌发与花粉管生长情况, 分析花柱 S-RNase、RNase 和外源 RNase 对花粉萌发和花粉管生长的影响, 方法简便可行。在离体条件下排除了其它因子的作用, 更有利于阐明花柱 S-RNase 对自花和异花花粉管生长的影响, 帮助人们理解花柱 S-RNase 与花粉管相互作用的生理机制。另一方面, 本研究虽然明确了内源和外源 RNase 对花粉萌发及花粉管生长的影响, 但对于该影响是如何产生的、花柱 S-RNase 特异性的本质是什么等问题, 有待进一步研究。

References

[1] Hiratsuka S, Hirata N, Tetsuka T, Yamamoto Y. Self-

incompatibility reaction of Japanese pear in various stages of floral development. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1985, 54: 9-14.

[2] Zhang S L, Hiratsuka S. Analysis varietal differences in self- and cross-incompatibility reactions of Japanese pears using stylar culture technique. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1999, 68: 373-383.

[3] Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. *Molecular & General Genetics*, 1993, 241: 17-25.

[4] Zhang S L, Hiratsuka S. Variations in S-protein levels in styles of Japanese pears and the expression of self-incompatibility. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1999, 68: 911-918.

[5] 张绍铃, 平塚伸, 徐国华, 房经贵, 刘友良. 梨自交不亲和及其亲和突变品种花柱内 S_4 (S_4^{SM}) 基因的表达与作用的比较. *植物学报*, 2001, 43(11): 1172-1178.

Zhang S L, Hiratsuka S, Xu G H, Fang J G, Liu Y L. Expression and possible role of S_4 (S_4^{SM}) genes in the style of self-incompatible pear cultivar and its self-compatible mutant. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(11): 1172-1178. (in Chinese)

[6] Hiratsuka S, Zhang S L, Nakagawa E, Kawai Y. Selective inhibition of the growth of incompatible pollen tubes by S-protein in the Japanese pear. *Sexual Plant Reproduction*, 2001, 13: 209-215.

[7] Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, Sakiyama F. Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 120: 326-334.

[8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.

[9] Brown P H, Ho T H D. Barley aleurone layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid. *Plant Physiology*, 1986, 82: 801-806.

[10] Zhang S L, Hiratsuka S. Cultivar and developmental differences in S-protein concentration and self-incompatibility in the Japanese pear. *Horticultural Science*, 2000, 35: 917-920.

[11] 徐义流, 张绍铃. 以 ^{32}P 示踪观察梨花粉管在自花与异花花柱中生长的方法. *植物生理学通讯*, 2003, 39(3): 238-239.

Xu Y L, Zhang S L. Method for observing radiotracer of pollen tube growth in self and non-self style with ^{32}P in Pear. *Plant Physiology Communications*, 2003, 39(3): 238-239. (in Chinese)

[12] Roiz L, Ozeri U, Goren R, Shoseyov O. Characterization of aspergillus nige B-1 RNase and its inhibitory effect on pollen germination and pollen tube growth in selected tree fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2000, 125: 9-14.