

自交不亲和杏李品种‘风味玫瑰’授粉早期花柱蛋白质差异分析

何兴波, 雷莉莉, 杨绍彬, 傅建敏, 李芳东*

(国家林业局泡桐研究开发中心, 河南 郑州 450003; 中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003)

摘要: 采用双向凝胶电泳和质谱检测技术, 对自交不亲和的杏李品种‘风味玫瑰’自花及异花授粉(‘风味玫瑰’×‘恐龙蛋’)的花柱进行差异性蛋白质组学研究。研究表明, 自花授粉与异花授粉有 79 个差异蛋白点, 表达量差异在 2 倍以上的蛋白点有 43 个, 其中自花授粉中表达丰度明显升高的蛋白点有 6 个, 表达丰度明显降低的蛋白点有 37 个。只有 34 个蛋白点在质谱分析中成功鉴定, 其中 5 种蛋白质分别为催化调节蛋白、防御/胁迫蛋白、结构蛋白等。这 5 种蛋白质直接或间接地影响花粉管在花柱中的生长。

关键词: ‘风味玫瑰’; 自交不亲和; 花柱; 蛋白质组学; 质谱鉴定

中图分类号: S725.7

文献标识码: A

Analysis on Differences of Protein in Stylar Canal During Early Pollination Associated with Self-incompatible *Prunus domestica* × *armeniaca* ‘Fengweimeigui’

HE Xing-bo, LEI Li-li, YANG Shao-bin, FU Jian-min, LI Fang-dong

(Paulownia R&D Center of China, State Forestry Administration, Zhengzhou 450003, Henan, China; Non-timber Forestry R&D Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, Henan, China)

Abstract: This study focused on the differences of protein in stylar canal between that from self-incompatible *Prunus domestica* × *armeniaca* ‘Fengweimeigui’ and that from cross-pollination (ACP) (‘Fengweimeigui’ × ‘Konglongdan’). Two dimension difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and mass spectrum (MS) detection techniques were used in this study. The results showed that there were 79 different protein spots in stylar canal between that from self-pollination and that from cross-pollination, and there was a huge difference, more than double, in terms of protein expression among 43 protein spots, including 6 up-expressed and 37 down-expressed in self-pollination stylar canal compared with that in cross-pollination stylar canal. Only 34 protein spots were identified unambiguously through mass spectrometry analysis, including 5 kinds which were catalytic protein, defence/stress protein, and structural protein, respectively.

Key words: *Prunus domestica* × *armeniaca* ‘Fengweimeigui’; self-incompatibility; stigma; proteomics; mass spectrum

杏李 (*Prunus domestica* × *armeniaca*) 为蔷薇科 植物, 于 2000 年从美国引进, 是否与李的种间杂交

收稿日期: 2014-01-06

基金项目: 公益项目“第二代杏李种间杂交新品种及栽培技术引进”(No. 2014-4-20).

作者简介: 何兴波(1988—), 男, 在读硕士研究生; 研究方向: 经济林栽培育种。Email: he_xingbo@126.com.

* 通讯作者: 研究员, 博导, 主要从事经济林栽培育种研究及农桐间作研究。电话: E-mail: lifangdong66@163.com.

品种^[1-2]。‘风味玫瑰’作为杏李的一种,在品质与抗逆性方面表现非常突出,然而由于自交不完全亲和性的原因,致使其在自然条件下‘风味玫瑰’自花结实率低^[3-6]。因此,开展相关研究对于合理配置授粉树种具有重要意义。目前,对于果树自交不亲和的研究主要集中在S糖蛋白作用的分子机理、不亲和反应的作用部位、S等位基因的确定和克隆等方面^[7]。在杏李自交不亲和性遗传研究中发现,花柱S-基因相同的杂交后代不同株系,自花结实率会出现显著差异,说明自交不亲和性不仅与花柱S-基因有关,还可能受其它基因影响^[8-9]。目前涉及自交不亲和性且在雌蕊特异表达的基因或蛋白质研究较少,主要有芸薹属自交不亲和系统中检测到的PRP^[10]、PR5K、PR5蛋白^[11]、PCP^[12]、SLG、SRK、PIP^[13]、SPII、THL、ARC^[9];茄属自交不亲和系统中检测到的PR5-like蛋白^[14]、PELPIII^[15-16]、CP100^[17];罂粟属自交不亲和系统中检测到的PIP^[18]、MIP^[19]。有报道表明柱头特异表达蛋白SLR1和SLG与花粉粘附有关,用SLR1、SLG各自抗体处理柱头后,花粉粘附变弱^[20]。SLR1、SLG可分别与花粉包被蛋白SLR1-BP和PCP-A1结合,这被认为在花粉粘附和萌发过程中起了重要作用^[21]。研究表明EXO70A1是花粉亲和的必需因子,抑制其在亲和性材料中的表达将使亲和花粉在水化和萌发初期被抑制,而在不亲和性材料中过量表达该蛋白则使材料呈部分亲和^[22]。

上述几个参与授粉早期识别的蛋白质都是通过遗传杂交和基因克隆等方法发现和鉴定的。蛋白质组学研究技术具有全信息化分析某一特定组织特定时期蛋白质表达谱的优势,目前该技术已成功用于油菜和梗稻花粉萌发和花粉管延伸关键蛋白^[25-26]以及油菜响应磷、硼胁迫信号关键蛋白^[23-24]等分离与鉴定工作。本试验中首次采用蛋白质组学方法,对杏李‘风味玫瑰’授粉早期花柱中差异蛋白质进行研究,以期发现更多与柱头—花粉互作相关蛋白质奠定基础,进而为深入研究孢子体型自交不亲和柱头排斥自花花粉接受异花花粉的分子机制提供新内容。

1 材料与方 法

1.1 材料及处理

田间试验于2013年3月在河南省平顶山市郟县安良镇玉龙山庄杏李资源圃进行,实验材料为8

年生的自交不完全亲和品种‘风味玫瑰’与异花授粉适宜品种‘恐龙蛋’^[27]。采集大蕾期‘风味玫瑰’和‘恐龙蛋’花朵,摘取花药,在24℃烘箱中烘干至散粉,收集花粉用于人工授粉并做花粉生活力检测。采用连被去雄法^[28]在杏李花大蕾期时去雄,人工自花及异花授粉后挂牌标记。采集自花和异花授粉24h后的花柱,依次编号,置于离心管中,于液氮中快速冷冻后置于-80℃冰箱中保存备用。

1.2 测定内容及方法

1.2.1 仪器与试剂

蛋白质电泳系统(美国Bio-Rad公司)、Ettan IPGphor II等电聚焦系统(美国GE公司)、Power-look 2001XL-USB扫描仪(UMAX公司)、ImageMasterTM 2D Platinum Softwre 5.0图像分析软件(美国GE公司)。

灭菌超纯水、SDS、Tris、过硫酸氨、TEMED、PMSF、甘油、硫酸铵、Urea、甘氨酸、考马斯亮蓝(G-250)、碘代乙酰胺、IPG-BUFFER(pH3-10)、Immobiline Drystrip干胶条pH3-10等、国产分析纯甲醇、乙酸、磷酸等。

1.2.2 蛋白质样品的准备

称取授粉后花柱样品各0.3g,置于液氮中研磨成细粉状,转入2ml离心管中。加入1.5ml在-20℃中预冷的TCA/丙酮溶液,-20℃沉淀过夜,4℃14000r·min⁻¹转速下离心1h,去除上清液;加入1.5ml含0.07%β-ME的冷丙酮,-20℃沉淀1h,4℃14000r·min⁻¹离心30min,去除上清重复3次;在-50℃下真空冷冻干燥成干粉,-80℃保存。

1.2.3 上样液的制备

向制备好的蛋白质干粉中加入0.5ml细胞裂解液(7mol·L⁻¹尿素,2mol·L⁻¹硫脲,4%CHAPS,40mmol·L⁻¹DTT,0.1mol·L⁻¹PMSF,0.5%的Buffer)混匀,4℃中静置4h。14000r·min⁻¹离心1h,取上清液。溶液采用Bradford法定量,-80℃保存。

1.2.4 双向电泳

第一向等电聚焦(IEF):上样量约为450μg,样品与水化液(7mol·L⁻¹尿素,2mol·L⁻¹硫脲,4%CHAPS,65mmol·L⁻¹DTT,0.002kg·L⁻¹Bio-Lyte,0.001%溴酚蓝)混合后体积约350μL。使用非线性IPG固相胶条(18cm,pH3~10),按照双向电泳操作手册操作,在水化槽中加入事先混合好的上样液,并在Ettan IPGphor II等

电聚焦仪中进行等电聚焦。仪器运行条件为 20℃, 50 V 4 h, 100 V 1 h, 500 V 1 h, 3 000 V 1 h, 8 000 V 60 000 VH 和 500 V 3 h。等电聚焦结束后立即进行胶条平衡, 将聚焦后的 IPG 胶条在 10 ml 平衡液 I (6 mol · L⁻¹ 尿素, 0.02 kg · L⁻¹ SDS, 0.375 mol · L⁻¹ Tris-HCl pH8.8, 30% 甘油, 0.02 kg · L⁻¹ DTT) 及 10 ml 平衡液 II (6 mol · L⁻¹ 尿素, 0.021 kg · L⁻¹ SDS, 0.375 mol · L⁻¹ Tris-HCl pH8.8, 20% 甘油, 0.04 kg · L⁻¹ 碘乙酰胺) 先后平衡 15 min, 再转移到 12% SDS-PAGE 凝胶 (33% ddH₂O, 11.25% 丙烯酰胺, 0.375 mol · L⁻¹ Tris-HCl pH8.8, 0.1% SDS, 0.1% 过硫酸氨, 0.04% TEMED) 顶端, 进行第二向 SDS-PAGE 电泳。第二向 SDS-PAGE 电泳: 将胶条与凝胶结合紧密, 并用低熔点琼脂糖封胶。将板胶置于 Bio-Rad PROTEAN II xi Cell 电泳系统, 采用稳定电流模式, 电流设定分两步: 1) 6 mA, 80 min, 2) 30 mA, 9 ~ 10 h。电泳结束后, 考马斯亮蓝染色。

染色的操作步骤: 1. 在固定液 (40% 甲醇, 10% 乙酸, 50% ddH₂O) 中震荡过夜; 2. 将凝胶移至配好的考马斯亮蓝 G-250 染色液震荡染色 13 h。3. 染色结束后将凝胶用 ddH₂O 脱色 1 h, 每 15 min 换一次 ddH₂O, 大约 3 ~ 4 次, 脱至背景近无色为止。

1.2.5 图像的采集

显色凝胶经 UMAX PowerLook 2001XL-USB 扫描仪扫描得到凝胶图像, 用 ImageMaster™ 2D PLatinum Software 5.0 图像分析软件对扫描获取的凝胶图像进行比对分析, 筛选 2 组间差异蛋白质点。

1.2.6 质谱鉴定

从凝胶上挖取差异蛋白点, 转入加有少量 ddH₂O 的 1.5 mL EP 管。对每一个点进行酶解、洗脱、得到肽段混合物进行 MALDI-TOF-TOF-MS 质谱分析, 获得一级、二级肽谱数据, 应用 MASCOT 软件进行肽指纹图谱鉴定, 在 NCBI nr 数据库鉴定蛋白质。数据统计时蛋白得分计算方法为 $S = -10 \times \log(P)$, 其中 P 比对匹配中的一个随机事件的可能性大小。肽匹配段数为每个蛋白样品与数据库蛋白匹配的肽段个数, 肽段覆盖率为匹配肽段的氨基酸总数占数据库匹配蛋白氨基酸数的百分比。最终结果中将得分不低于 65, 与已知蛋白的匹配肽段数不低于 5 段, 且肽段覆盖率不低于 15% 的蛋白认为是可信蛋白。检索条件为: 胰蛋白酶酶解, 物种来源为

绿色植物, 固定修饰 Carbamidomethyl (C), 可变修饰 Oxidation (M), 肽段质量容差为 $\pm 10^{-4}$, 碎片离子的容差为 ± 0.4 D。

2 结果与分析

2.1 材料亲和性鉴定

以‘风味玫瑰’为母本, 分别进行花期自交与异花授粉 (×‘恐龙蛋’)。自花授粉坐果率为 8.29% 明显低于人工异花授粉坐果率 26.13%, 因此, 判断‘风味玫瑰’为自交不完全亲和材料, 并能与‘恐龙蛋’异交亲和。

2.2 双向电泳图谱的建立与图像分析

对授粉后 24 h 的花柱总蛋白进行双向电泳 (图 1), 初步分析发现蛋白点主要集中在 pI 5 ~ 9, 相对分子质量约为 20.1 ~ 97.2 kD。在正极端的蛋白点密度明显高于负极端, 相对分子质量较大的蛋白明显多于相对分子质量较小的蛋白。

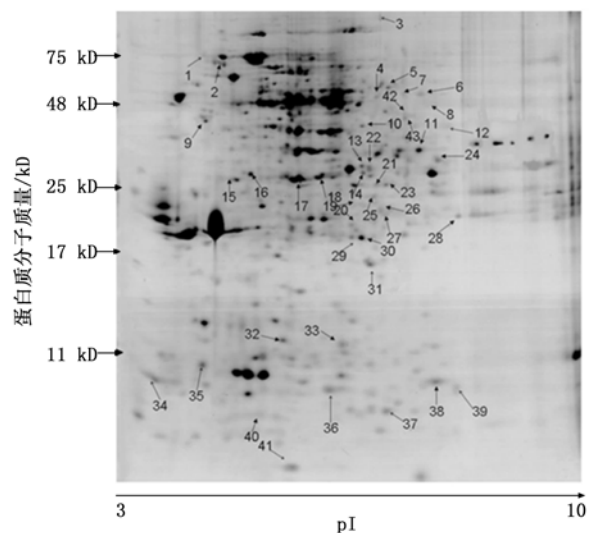


图1 优化后的双向电泳图谱

2.3 蛋白表达谱 ImageMaster 分析

从不同花粉授粉的两组中选择 3 张分离度和重复性较好的清晰图像, 载入 ImageMaster 软件中进行图像分析。在自花授粉与异花授粉对比组中, 最终得到 79 个差异点 (图 2)。去掉清晰度、分离度不很理想的点, 并且以优先选择特异表达, 从蛋白量变化大的点到变化小的点为原则, 总共筛选表达量差异在 2 倍以上的蛋白点 43 个, 并进行质谱分析。这些点在两组中都进行了表达, 其中自花授粉 24 h 的花柱表达丰度明显升高的有 6 个 (11、13、22、35、41、43), 其余表达丰度明显降低。

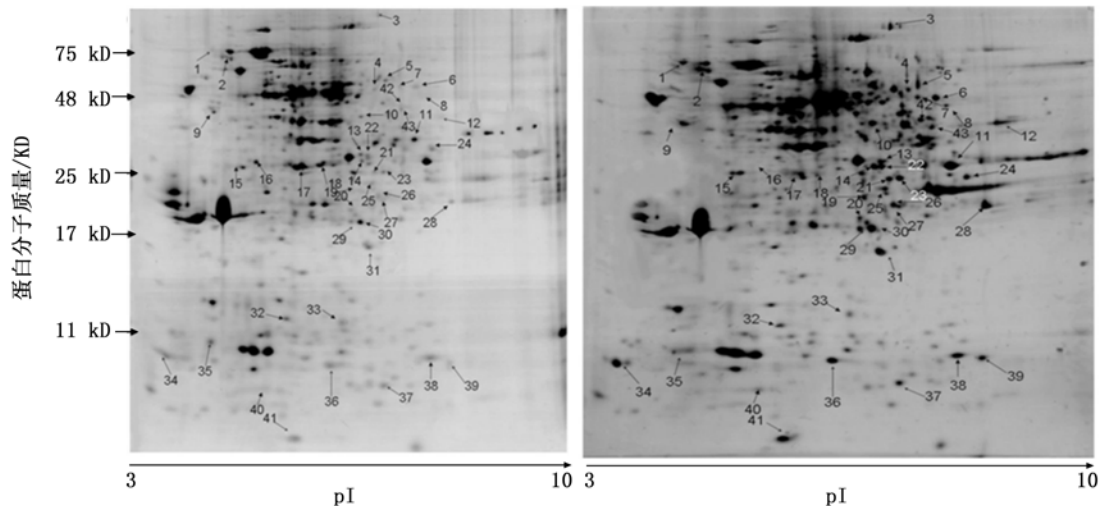


图2 自花授粉(左)与异花授粉(右)花柱蛋白双向电泳图谱

2.4 差异蛋白点的 MALDI-TOF/TOF MS 分析

为进一步了解差异表达蛋白的生物学功能,将43个差异蛋白点进行切胶、酶解、质谱分析。在数据库中检索获得43个差异蛋白质的肽质量指纹图谱数据,去除杂质峰值,用 Mascot 软件搜索数据库,结合双向凝胶电泳相应点的表现等电点(pI)、分子量、匹配肽段进行综合分析,共比对鉴定出34个蛋白点(表1),另外有9个蛋白点因匹配分值低未得到鉴定。依据 UNIPROT 数据库及相关文献查询,这34个蛋白质按功能可分为催化调节蛋白、防御/胁迫蛋白、结构蛋白、能量代谢蛋白及未知蛋白5类。其中催化调节蛋白质所占比例最高,为58.82%,防御/胁迫蛋白、结构蛋白、能量代谢蛋白及未知蛋白所占比例分别为11.76%、17.65%、8.82%、2.94%(图4)。

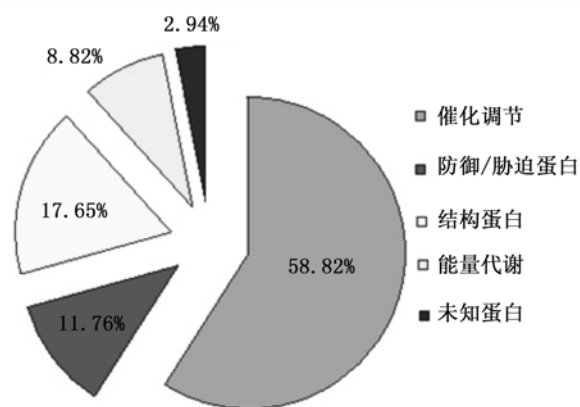


图3 各类蛋白的比例

3 讨论

本试验中共选择出了76个差异蛋白,而表达量差异在2倍以上的有43个。通过质谱成功鉴定的

有34个,鉴定成功率较高。另外9个没有成功鉴定的原因可能是尚无杂交杏李基因组序列可参考,所以质谱结果只能与其他绿色植物数据库进行匹配,致使一些质谱峰图不错的蛋白质无法与数据库信息对应,导致一些蛋白质无法成功鉴定。

由于分子生物学技术的广泛应用,加快了植物自交不亲和性的研究进程。1981年首次从烟草花柱可溶性蛋白中分离出自交不亲和S等位基因产物S-糖蛋白,1986年克隆了S-cDNA,使有关S糖蛋白的功能研究有了较大突破,认为S等位基因表达产物是自交不亲和反应中的“关键”蛋白^[29]。在本试验中并未监测到S-蛋白,但这并不排除S-蛋白在异花与自花授粉后存在表达差异的可能。

本试验结果显示,‘肌动蛋白’、‘微管蛋白’等在(不)亲和反应中的变化,可能与授粉后花粉管的生长与抑制有关。花粉萌发过程中细胞骨架的功能,尤其是依靠肌动蛋白的细胞学过程,比如细胞质流动,以及囊泡在花粉管顶端的极性运输和分泌等已有较为深入的研究^[30-32]。张鹏等^[33]运用低熔点蜡和间接免疫荧光染色方法,对加杨亲和性较低的授粉组合中的柱头花粉细胞微管骨架进行观察,发现在花粉管停止生长后花粉细胞包括花粉管内部无明显的微管骨架结构,并且细胞内微管骨架大量解体。这说明肌动蛋白的活性和微管蛋白影响花粉管延伸进入子房,从而影响雌雄配子受精,其中14号和40号被鉴定为‘ β -1-微管蛋白’和‘肌动蛋白1’并且两者在异花授粉实验中表达上调2~4倍,据此推断肌动蛋白和微管蛋白的表达促进花粉管的正常生长。本试验25号被鉴定为疑似‘蛋白 ABIL5’,在 UNIPROT 检索发现其参与肌动蛋白和微管组织

表1 选取的差异蛋白质谱鉴定结果

功能分类	序号	蛋白名称	来源物种	编号/gi	分子量/PI	匹配率/ 匹配段数	得分	变化量
催化调节	2	蒲公英赛醇合酶	红海榄	gi1353678133	88915/6.37	24%/5	138	-3
	3	DNA 引导核糖核酸聚合酶亚基	玉兰	gi1122164451	157655/9.35	23%/34	106	-6
	6	Δ -5-羧酸-1-吡咯啉合成酶乙谷氨酸	拟南芥	gi11709535	79164/9.25	19%/27	133	-4
	11	三角形四肽重复硫氧化还原蛋白	拟南芥	gi175336154	76980/9.03	23%/14	246	+3
	18	核酮糖二磷酸羧化酶大链的 Rubisco 大亚基	杨桃	gi117367743	52313/5.46	42%/11	153	-2
	19	移位酶	豌豆	gi125091388	34193/4.89	45%/13	152	-4
	21	钙网蛋白	山杏	gi111131904	48558/4.64	26%/27	398	-8
	22	内含子成熟酶	烟草	gi168052626	60758/9.63	19%/7	132	+2
	23	钙调蛋白结合受体样胞质激酶	拟南芥	gi175331192	46374/9.26	16%/8	209	-5
	24	核糖体再循环因子	菠菜	gi17388105	30640/9.4	38%/12	172	-3
	25	疑似蛋白	粳稻	gi175106329	28274/8.91	29%/10	144	-7
	27	延长因子1 α	拟南芥	gi1332190093	26630/8.47	16%/6	96	-3
	29	DEAD-box ATP 依赖核糖核酸解旋酶 3	向日葵	gi1302595800	24828/5.97	29%/8	156	-5
	30	二硫键异构酶	杜兰戈根	gi111133818	57396/4.84	22%/10	156	-4
	31	GTP 结合蛋白	粳稻	gi175337604	24101/9.28	26%/7	192	-5
	32	氮调节蛋白 P-II 同源物	粳稻	gi175289810	22744/9.88	70%/8	132	-3
	33	Rac-likeGTP 结合蛋白 2	粳稻	gi175254124	23921/9.47	33%/7	92	-2
	34	延伸因子 G	白芥子	gi11346180	16063/5.21	42%/6	114	-6
	36	蛋白激酶 C	雪里蕻	gi11177046	12674/6.56	39%/5	132	-4
	38	核糖核酸介导脱氧核糖核酸聚合酶同源物	月见草	gi1401036	16960/9.89	48%/12	241	-4
防御蛋白	1	富含甘氨酸 RNA 结合蛋白	菠菜	gi13913786	73 775/5.08	23%/15	568	-6
	13	热休克 70kDa 蛋白	豌豆	gi1585272	72 428/5.81	31%/21	163	+2
	26	热胁迫转录因子 A-5	粳稻	gi175291070	53 308/5.30	33%/13	93	-5
结构蛋白	41	预测防御蛋白样蛋白 258	拟南芥	gi1122209430	9 623/9.26	15%/18	102	+3
	5	结构维持的染色体蛋白 4	拟南芥	gi175333958	141 442/9.91	24%/6	192	-5
	14	β -1-微管蛋白	豌豆	gi1267072	51 103/4.74	47%/22	184	-4
	16	30S 核糖体蛋白 S3	菟丝子	gi1172048146	25 255/10.06	37%/9	182	-4
	28	囊泡关联膜蛋白 713	拟南芥	gi127805763	25 475/9.17	52%/11	139	-6
	37	核糖体蛋白 S18	落叶松	gi162287470	10 126/10.06	54%/10	130	-5
	40	肌动蛋白 1	胡萝卜	gi1113217	10 120/11.73	54%/5	192	-2
能量代谢	15	ATP 合成酶亚基 beta	烟草	gi1114421	59 933/5.95	56%/34	909	-8
	20	葡聚糖内切-1,3- β -葡糖苷	杏	gi11729981	26 602/4.84	33%/8	111	-4
	17	PSBP 域-含蛋白 4	拟南芥	gi1190358910	28 655/9.60	15%/5	136	-3
未知蛋白	39	未知蛋白	拟南芥	gi175155845	13 113/9.71	51%/7	130	-4

注:变化量中“+/-”表示自花授粉花柱蛋白表达差异上调/下调。

的监管,但其具体生理功能过程还未有详细资料供参考。

Brewbaker 和 Kwack(1963)^[34]发现 Ca^{2+} 是花粉萌发以及花粉管生长所必需的, Rathore 等(1991)^[35]检测了百合花粉管中钙离子分布情况,发现胞质中自由钙离子浓度在顶端比较高,且在顶端区域呈现梯度浓度分布的特点。在鉴定成功的蛋白质中有两个蛋白质与 Ca^{2+} 结合相关,其中 23 号被鉴定为‘钙调蛋白结合受体样胞质激酶’,21 号被鉴定为‘钙网蛋白’,两者在异花授粉中表达量上升 3~8 倍,且两种蛋白参与 Ca^{2+} 结合、小泡运输、内吞等生理活动,可能参与从胞外将 Ca^{2+} 运输到花粉管细胞内部以及其他与 Ca^{2+} 相关的生理过程,但其在花粉管生长过程中发挥的具体作用和两者之间的作用差异还需要进一步的研究。同时,31 号和 33 号分别被鉴定为‘GTP 结合蛋白’和‘Rac-likeGTP 结合蛋白 2’,二者简称 G 蛋白,其有多种调节功能,包括 G_s 和 G_i 对腺苷酸环化酶的激活和抑制、对 cGMP 磷酸二酯酶的活性调节、对磷脂酶 C 的调节、对细胞内 Ca^{2+} 浓度的调节等,另外还参与门控离子通道的调节,能够参与纤维状肌动蛋白的动力学^[36],据此推断二者在花粉管的正常生长过程中具有不可或缺的作用。

一些代谢酶,如‘二硫键异构酶’、‘DNA 引导核糖核酸聚合酶亚基’、‘核糖核酸介导脱氧核糖核酸聚合酶同源物’、‘核糖体再循环因子’等为蛋白质生成和遗传物质复制的催化酶,其中尚桂军等^[37]研究发现 24 号‘核糖体再循环因子’在蛋白质生物合成中参与第四步翻译终止后,与‘延伸因子-G’(elongation factor G, EF-G)的协同作用使复合物解体,以保障下一步生物合成所需原料的充足。因此其表达量的上调可能与花粉萌发和花粉管生长中新合成蛋白质的装配效率和亚细胞定位有关。另外,诸如 20 号‘葡聚糖内切-1,3- β -葡糖苷’、36 号‘蛋白激酶 C’等在异花授粉后更多的被诱导。这说明在亲和反应中涉及蛋白的糖代谢反应更活跃,这可能与亲和性花粉管比不亲和性花粉管更快进入子房有一定关系。

在成功鉴定的差异蛋白质中既有花粉管生长发育所必需的催化调节蛋白,也有与防御/胁迫相关的蛋白。在前人的研究中发现,芸薹属花粉外壳蛋白 PCP-A1 就属于防御蛋白,PCP-A1 与花粉在柱头上的粘附与萌发有关^[21]。Okuda 等^[39]发现了两种防

御素类蛋白,命名为 LUREs,在助细胞中大量表达,并表现出对花粉管的诱导作用。另外,在玉米雌配子体中特异表达的一个防御素类—半胱氨酸富集蛋白,在调控花粉管停止生长,破裂并释放出精子的过程中起作用^[40]。一个与白粉菌抗性有关的蛋白质—NORTIA 在助细胞接受花粉管的过程中起作用,这表明这种蛋白参与了花粉管的接受与白粉菌感染这两个过程^[41]。本试验中 1 号蛋白质鉴定为‘富含甘氨酸 RNA 结合蛋白’(GRPs),GRPs 在前人的研究中发现其参与植物对环境胁迫的响应和抵御^[42];13 号和 26 号分别被鉴定为‘热休克 70kDa 蛋白’(HSP70)‘热胁迫转录因子 A-5’,HSP70 在细胞凋亡过程中起着抗细胞凋亡的作用,作用机制与抑制应激活化蛋白激酶和抑制促凋亡基因的表达有关。6 号为脯氨酸合成酶的一个亚基,脯氨酸是植物在受到各种非生物胁迫时(如干旱和盐胁迫)在体内大量积累维持渗透压稳定和氧化还原反应平衡的一种重要的物质^[43]。上述说明,参与防御的蛋白可能在花粉萌发以及花粉管延伸到生长停止、破裂等一系列过程中发挥作用。花粉与柱头互作也可能是多条信号通路共同完成,即一种蛋白可能参与多条信号通路,多条信号通路可以共同发挥作用以完成此项生命活动而激发植物体内的防御系统。本试验中 13、41 号蛋白在亲和授粉中表达量降低,这些蛋白质是否参与了柱头与花粉的互作,并在花粉粘附和生长等过程中起作用还有待于进一步探索研究。

在鉴定出的蛋白点中,32 号‘氮调节蛋白’在调节细胞分裂和胚胎发育等机体中起作用,而且这些调节过程中涉及大量的蛋白,该蛋白上调表达,可能在新蛋白以及相关蛋白大量合成中起重要作用。在上述一系列生理过程中涉及到能量的消耗,糖类物质的代谢是能量的主要来源,其中两个蛋白质分别为 29 号‘水解酶’和 39 号‘蛋白质裂解酶’,在亲和授粉中表达上调,两者可能与糖酵解有关。在亲和授粉组合中 11 号和 22 号蛋白表达丰度降低,两者分别在叶绿体中参与光合作用和胁迫下萌发、幼苗发育过程中参与的信号调节,上述蛋白在花柱中的具体生理功能尚需要进一步的研究。

通过大量查阅前人的研究,推断以上鉴定成功的蛋白质直接或间接的参与花粉在柱头上的萌发和生长。但该试验中分离并鉴定成功的蛋白质并非花粉—柱头相互感应产生的全部物质,而且在鉴定

成功的蛋白质中有多种蛋白的具体生理功能尚未明确,这些蛋白质是否参与了柱头和花粉的互作,并在花粉粘附和生长等过程中起的作用需通过基因沉默、转基因等方法来鉴定。

参考文献:

- [1] 李芳东,杜红岩,杨绍彬,等. ‘风味玫瑰’—极早熟杏李杂交新品种[J]. 中国果树,2007,(3):91-96.
- [2] 李芳东,杜红岩,杨绍彬,等. 杏李种间杂交极早熟新品种风味玫瑰[J]. 中国果树,2007,(3):5-7.
- [3] 王熙龙,曹振强. 风味玫瑰杏李早期丰产栽培技术[J]. 北方果树,2005(4):29.
- [4] 李小远,马玉磊,刘 阳,等. 小报春不同授粉组合亲和性研究[J]. 西北植物学报,2012,32(12):2426-2431.
- [5] 雷家军,吴 超. 卷丹与亚洲百合种间杂交花粉管生长的荧光观察[J]. 东北农业大学学报,2012,43(1):117-120.
- [6] 罗春香,缙红星,盛瑞芳,等. 杏李杂交种风味玫瑰引种表现及主要栽培技术[J]. 山西果树,2011,1:14-15.
- [7] 陈 超,李保国,齐国辉,等. 果树自交不亲和机理及应用研究进展. 河北林果研究,2005,20(1):86-90.
- [8] 吴 燕,陈学森,冯建荣,等. 杏杂种一代群体 S 基因的遗传研究. 园艺学报,2005,32(4):397-402.
- [9] Silva N F, Goring D R. Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants[J]. Cellular and Molecular Life Sciences,2001,58: 1988-2007.
- [10] Foster E, Levesque-Lemay M, Schneiderman D, et al. Characterization of a gene highly expressed in the Brassica napus pistil that encodes a novel proline-rich protein[J]. Sex Plant Reprod, 2005, 17:261-267.
- [11] Wang X, Zafian P, Choudhary M, et al. The PR5K receptor protein kinase from Arabidopsis thaliana is structurally related to a family of plant defense proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1996, 93:2598-2602.
- [12] Furuyama T, Dzelzkalns V A. A novel calcium-binding protein is expressed in brassica pistils and anthers late in flower development [J]. Plant Molecular Biology, 1999,39:729-737.
- [13] Fukai E, Nishio T, Nasrallah M. Molecular genetic analysis of the candidate gene for MOD, a locus required for self-incompatibility in Brassica rapa[J]. Molecular Genetics and Genomics,2001,265: 519-525.
- [14] Sassa H, Hirano H. Style-specific and developmentally regulated accumulation of a glycosylated thaumatin/PR5-like protein in Japanese pear (Pyrus serotina Rehd.) [J]. Planta, 1998,205:514-521.
- [15] De Graaf B H J, Knuiman B A, Derksen J, et al. Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of Nicotiana tabacum[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(380):55-63.
- [16] De Graaf B H J, Knuiman B A, van Der Weerden G M, et al. The PELP III glycoprotein's in Solanaceae: stylar expression and transfer into pollen tube walls [J]. Sex Plant Reprod, 2004, 16: 245-252.
- [17] Expression of an isoflavone reductase-like gene enhanced by pollen tube growth in pistils of Solanum tuberosum [J]. Plant Molecular Biology, 1997,33:923-929.
- [18] O'Brien M, Bertrand C, Matton D P. Characterization of a fertilization-induced and developmentally regulated plasma-membrane aquaporin expressed in reproductive tissue, in the wild potato Solanum chacoense Bitt [J]. Planta, 2002,215: 485-493.
- [19] Kuboyama T. A novel thaumatin-like protein gene of tobacco is specifically expressed in the transmitting tissue of stigma and style [J]. Sex Plant Reprod, 1998,11:251-256.
- [20] Luu D T, Marty-Mazars D, Trick M, et al. Pollen-stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SLR1 glycoproteins [J]. Plant Cell, 1999,11(2):251-262.
- [21] Doughty J, Dixon S, Hiscock S J, et al. PCP-A1, a defensin-like Brassica pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression [J]. Plant Cell, 1998, 10(8):1333-1347.
- [22] Samuel M A, Chong Y T, Haasen K E, et al. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in Brassica and Arabidopsis stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex [J]. Plant Cell, 2009,21(9): 2655-2671.
- [23] Dai S, Chen T, Chong K, et al. Proteomics identification of differentially expressed associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated Oryza sativa pollen [J]. Mol Cell Proteomics,2007,6(2):207-230.
- [24] Sheoran I S, Pederson E J, Ross A R, et al. Dynamics of protein expression during pollen germination in canola (Brassica napus) [J]. Planta, 2009,230(4):779-793.
- [25] Wang Z, Wang Z, Shi L, et al. Proteomic alterations of Brassica napus root in response to boron deficiency [J]. Plant Mol Biol, 2010, 74(3):265-278.
- [26] Yao Y, Sun H, Xu F, et al. Comparative proteome analysis of metabolic changes by low phosphorus stress in two Brassica napus genotypes [J]. Planta, 2011, 233(3):523-537.
- [27] 杨绍彬,李芳东,杜红岩,等. 杏李种间杂交品种适宜授粉组合筛选试验 [J]. 中国果树,2008(5):28-30.
- [28] 郑 洲,陈学森,冯宝春,等. 杏品种授粉生物学研究 [J]. 果树学报,2004,21(6):327-331.
- [29] 张绍铃,房经贵,杨记碾. 果树自交不亲和性的遗传与生理机制及其研究 [J]. 果树学报,2001,18(1):49-52.
- [30] Pieton JM, Steer MW. A model for the mechanism of tip extension in pollen tubes [J]. Journal of Theoretical Biology,1982, 98: 15-20.
- [31] Pierson ES. Rhodamine-phalloidin staining of F-actin in pollen after dimethylsulphoxide permeabilization [J]. Sex Plant Reproduction, 1988,1:83-87.
- [32] Lazzaro M D microtubules. The spermatogenous body cell of the conifer Picea abies contains actin Protoplasma [J]. 1998, 201:194-201.

- [33] 张 鹏. 杨树杂交不亲和性的细胞学及生理生化基础[D]. 北京:北京林业大学,2013.
- [34] 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 (9): 859 - 865.
- [35] Rathore K S, Cork R J, Robinson K R. A cytoplasmic gradient of Ca^{2+} is correlated with the growth of lily pollen tubes[J]. *Dev Biol*, 1991, (148):612 - 619.
- [36] Gu Y. Q, Vernoud V, Fu Y, *et al.* ROPgTPase regulation of pollen tubegrowth through the dynamics of tip-localized F-actin[J]. *J. Exp. Bot*,2003,(54):93 - 10.
- [37] 尚桂军. TleRRF, AmCBL1 初步晶体学和嗜热菌 ATCC27502-ATP 合酶晶体生长研究[D]. 北京:北京林业大学. 2010.
- [38] Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, *et al.* Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells[J]. *nature*, 458 (7236):357 - 361.
- [39] Amien S, Kliwer I, Márton M L, *et al.* Defensin-like ZmES 4 mediates pollen tube burst in maize via opening of the potassium channel KZM1[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8 (6):e1000388.
- [40] Kessler S A, Shimosato-Asano H, Keinath N F, *et al.* Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion[J]. *Science*, 2010, 330:968 - 971.
- [41] 张水军,曾千春,卢秀萍,等. 植物富含甘氨酸蛋白的研究进展[J]. *中国农学通报*,2010,26(4):54 - 58.
- [42] 孙培亮,王志亮,李金明,等. 热休克蛋白 70 研究新进展[J]. *中国兽医学报*,2007,27(2):284 - 288.
- [43] Lehmann S, Funck D, Szabados L,*et al.* Proline metabolism and transport in plant development[J]. *Amino Acids*, 2010,39:949 - 962.