

沙田柚花柱蛋白对花粉管生长的影响^{*}

陈腾土

(广西柑桔研究所, 桂林 541004)

杨小华 薛妙男

(广西师范大学生物系, 桂林 541004)

摘要 本文以沙田柚及其授粉树种酸柚为材料, 对其花粉在不同培养介质中的萌发率进行测定, 筛选了 0.2~0.4 mol/L 聚乙二醇-400 (PEG-400) + 0.01% 硼酸作为花粉萌发介质。用授粉后 3 d 的花柱提取液进行沙田柚、酸柚花粉萌发抑制实验, 花柱提取液对自交花粉萌发无抑制作用, 明显地抑制花粉管的生长。其中以花柱提取液的 35% 饱和度硫酸铵级分对花粉管伸长的抑制最明显。模拟了花粉在雌蕊中的生长方式, 进行花粉萌发生长, 能收集到较多的花粉管, 为研究花粉管的 S-糖蛋白提供了材料。

关键词 沙田柚; 花柱蛋白质; 花粉管生长抑制

Effects of the stylar proteins on the pollen tube growth of shatinyu

Chen Tengtu

(Guangxi Citrus Research Institute, Guilin 541004)

Yang Xiaohua Xue Miaonan

(Biological Department, Guangxi Normal University, Guilin 541004)

Abstract The pollen germination rates of shatinyu (*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.) and its pollinating plant common pomelo, in the various culture medium were measured. 0.2~0.4 mol/L PEG-400 and 0.01% H_3BO_3 was the culture medium for the pollen germination. The inhibitive experiments of the pollen germination of the two materials were carried on within the stylar extracting solutions in the third day after pollination. The solution didn't inhibit the germination of the self-pollinated pollen, but it obviously inhibited the growth of the pollen tube. The solution (at 35% ammonium bisulphate staging) very obviously inhibited the extension of the pollen tube. The growth ways of the pollen in the pistil were initiated, and the pollen germinated and grew. The pollen tubes were collected for the researches about S-glycoproteins in there.

Key words Shatinyu (*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.); stylar proteins; inhibition of the pollen tube

1997-07-21 收稿

第一作者简介: 陈腾土, 男, 1947 年出生, 副研究员, 长期从事沙田柚、柑桔的试验研究工作。

*国家自然科学基金、广西自然科学基金资助项目

配子体型自交不亲和性在雌蕊一方已经对 10 多种不亲和基因相关蛋白进行了分离鉴定^[1, 5]。但是, 要对自交不亲和分子机理的全面了解, 还取决于对花粉 S 基因编码产物的认识, 因此克隆分离花粉 S 基因编码产物, 是当前国内外研究自交不亲和分子生物学的重要内容^[7, 8, 9, 3]。究其原因, 要从花柱中收集一定数量的花粉管的方法不多。本文以沙田柚 [*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.] 为材料, 授粉树种酸柚作对照, 采用不同的授粉方式和花粉离体萌发, 进行花粉萌发及其抑制试验, 以期与研究花粉管 S 基因蛋白提供材料, 探讨沙田柚自交不亲和分子机理, 为克服沙田柚自交不亲和性, 提高座果率, 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

沙田柚和酸柚花粉和花柱均采自桂林广西柑桔研究所实验地, 为 10~15 a 生结果树。

1.2 方法

1.2.1 沙田柚花粉离体萌发培养基的筛选 采用 4 种萌发介质: ① 15%蔗糖 + 0.01%硼酸; ② 15%蔗糖 + 0.01%硝酸钾 + 0.02%硫酸镁 + 0.03%硝酸钙 (即 BKS-15) + 0.01%硼酸; ③ 0.2 mol/L 聚乙二醇-400 (PEG-400) + 0.01%硼酸; ④ 0.4 mol/L PEG-400 + 0.01%硼酸。以酸柚花粉作对照, 取盛花期新鲜花粉于 30 °C 下薄层振荡培养 16 h, 收集、镜检。

1.2.2 花柱提取液制备及其对花粉离体培养的影响 ①人工自交授粉: 沙田柚 × 沙田柚, 酸柚 × 酸柚, 授粉后 3 d, 分别取花柱作材料; ②花柱蛋白质的提取, 提取液为 0.1 mol Tris-HCl 缓冲液 (内含 0.5 mol 蔗糖, 0.006 mol 抗坏血酸, 0.006 mol 半胱氨酸) pH 8.0, 1 g 花柱加 2 ml 提取液, 冰浴中在研钵内研磨匀浆, 匀浆液经 12 000 r/min 冰冻离心 15 min, 取上清液, 加入分析纯硫酸铵至 35% 饱和度进行盐析, 离心取沉淀部分, 上清液继续加硫酸铵至 60% 饱和度再盐析, 离心取沉淀部分。将上述两沉淀部分分别用双蒸水透析 24 h, 再离心分别收集沉淀部分备用; ③花柱蛋白提取对花粉的离体培养, 用“沙 × 沙”、“酸 × 酸”二种花柱的两个级分蛋白提取液分别对沙田柚和酸柚花粉进行培养 (30 °C) [2 ml 0.4 mol/L PEG-400 + 2 ml 蛋白提取液 (蛋白质沉淀 0.1 g 加 10 ml PBS 溶解)], 16 h 后, 收集、镜检。

1.2.3 采用不同的授粉方式进行花粉萌发和花粉管收集 ①切断柱头进行截面授粉。切除柱头后, 将花柱切成三等分, 分别在截面授粉后将切段插入灭菌的琼脂培养基培养, 12 h 后, 用毛笔或刀片将花粉刷下或刮下, 收集到 Triton-100 中, 将不同段截面收集到的花粉管进行镜检, 并将各花柱段进行冰冻切片, 切片厚 50~60 μm, 苯胺蓝染色, 荧光显微镜观察; ②在整个雌蕊的 1/2 处用刀切开成两段, 将带柱头端和子房端插入消毒琼脂培养基中, 进行断面授粉, 按①法进行镜检; ③柱头授粉后, 按照花粉管在花柱中通过的速度, 在花粉管达到花柱 1/4、2/4 和 3/4 前, 切断靠子房端的花柱, 将带柱头的花柱分别插入固体培养基中, 采用氯霉素进行外植体消毒, 在无菌条件下进行, 培养 2 d 后取花柱进行镜检。或将花柱插入封口膜固定于小培养皿口上, 皿中放入培养液, 进行诱导培养, 24 h 后, 收集花柱, 进行镜检。

2 结果

2.1 花粉离体培养介质的筛选。

从花粉离体培养介质的筛选结果 (表 1) 可看出在 4 种萌发介质中, 花粉的萌发率相当, 都在 50% 左右, 对照酸柚比沙田柚高 8% 左右, 萌发较整齐。

2.2 花柱蛋白提取液对花粉萌发及花粉管生长的影响。

从试验的结果(表2)可看出授粉后3d的花柱蛋白提取液的两个硫酸铵级分中沙田柚和酸柚花粉均能萌发,萌发在35%硫酸铵级分中抑制更为明显,花粉管长度在10~20 μm 范围内

表1 不同花粉培养基的花粉萌发率

Table 1 The germination rates of the pollens in the various pollen culture medium

培养基 Culture medium	种类 Type	花粉总数 Total of pollens	萌发个数 Number of germination	萌发率 Germinative rate (%)
15%蔗糖 + 0.01%硼酸	沙田柚	47	26	55.3
	酸柚	49	31	63.3
BKS 15	沙田柚	74	37	50.0
	酸柚	77	45	58.4
0.2 mol/L PEG-400 + 0.01% 硼酸	沙田柚	78	38	48.0
	酸柚	59	33	55.9
0.4 mol/L PEG-400 + 0.01% 硼酸	沙田柚	109	58	53.1
	酸柚	117	65	55.3

表2 沙田柚和酸柚花柱蛋白提取液中花粉萌发率和花粉管长度

Table 2 The germination rates of the pollens and the lengths of the pollen tubes in the protein extracting solutions from the styles of shatinyu and acid pomelo

花粉类型 Type of pollen	花柱蛋白提取液 Protein extracting solutions of the styles	(NH ₄) ₂ SO ₄ 级分 (NH ₄) ₂ SO ₄ staging (%)	第一次萌发率 the first Germination rate (%)	第二次萌发率 The second germination rate (%)	花粉管长度 Length of pollen tube (μm)
沙田柚	沙×沙	35	32.3	27.3	10~20
		60	35.3	30.3	15~25
酸柚	沙×沙	35	37	38.1	20~40
		60	36	36.4	20~45
沙田柚	酸×酸	35	34.2	35.5	20~40
		60	33.5	34.3	20~45
酸柚	酸×酸	35	40.0	41.0	20~45
		60	41.2	39.0	20~48

(图1),对照酸柚花粉管长度在20~45 μm 范围内(图2)。由此表明,沙田柚花柱蛋白提取液中存在抑制自花花粉管生长的物质,此物质并不抑制异源花粉管的生长。

2.3 切断柱头进行花柱切面授粉

从1/4切段面上收集到提取液中的花粉管量很少,花粉管已伸入花柱,较难括下来(图3)。2/4、3/4切段面上收集到的提取液中花粉管数量较多,荧光显微镜观察发现花粉管短粗,停在切面上较多,稍将切面处压破,每一切面可收到近100条花粉管(图4)。从花柱1/2处将花柱掰断后的子房端切面上花粉管的生长状态和图4相似,靠柱头端的花柱切面上由于有大量分泌液,花粉充分吸水,花粉管都分布于表面,是获取花粉管量最多的场所。

柱头授粉后,在其相对一端的1/4切口上,偶而发现有花粉管伸出(图5),在2/4和3/4断

面上见不到花粉管。



图1 沙田柚花粉在“沙×沙”花柱蛋白提取液 35%硫酸铵级分中的萌发长度 (10~20 μm)
 Fig 1 The germination lengths of the pollens of Shatianyu in the stylar protein extracting solutions (at 35% ammonium bisulphate staging) of shatianyu. (10~20 μm)

图2 酸柚花粉在“沙×沙”花柱蛋白提取液 35%硫酸铵级分中的萌发长度 (20~40 μm)
 Fig 2 The germination lengths of the pollens of acid pomeb in the stylar protein extracting solutions (at 35% ammonium bisulphate staging) of shatianyu. (20~40 μm)

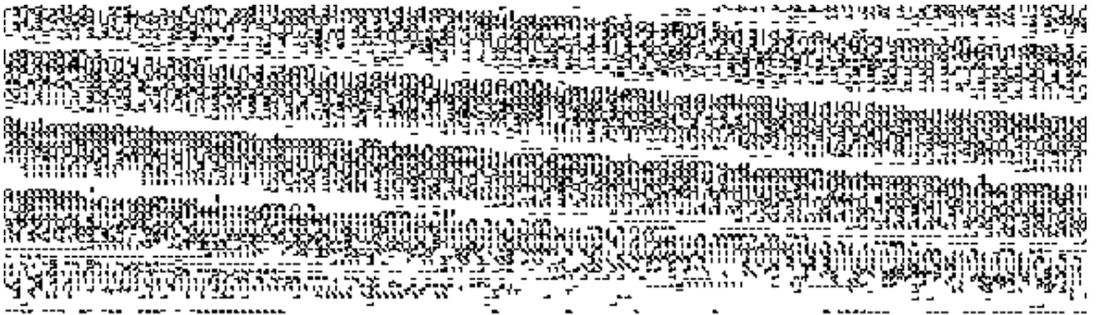


图3 沙田柚花柱 1/4 切段切面上花粉管已伸入到花柱道
 Fig. 3 The pollen tubes were into the stylar canal on the 1/4 stylar section of shatianyu

图4 沙田柚花柱 2/4 和 3/4 切段切面上花粉管多停留在表面，伸入很浅
 Fig. 4 The pollen tubes stayed on the section and were not long of stretching on the 2/4 and 3/4 stylar sections of shatianyu

3 讨论

(1) 花粉离体萌发培养介质一般都用蔗糖，我们在对花粉管壁蛋白提取纯化中，发现以蔗糖为介质时，收集到的萌发液难以浓缩抽干。采用 0.2~0.4 mol 聚乙二醇-400 作萌发介质，萌发率和蔗糖相当，PEG-400 对细胞无毒害，也不为细胞所代谢，能提供的水势范围宽，而且可以克服蔗糖介质难以浓缩抽干的缺陷，是一种较为理想的萌发介质。与杨中汉等^[4]百合花粉萌发结果是一致的。

(2) 授粉后 3d 的沙田柚花柱蛋白提取液, 不抑制自交花粉萌发, 但明显抑制自交花粉管生长, 其中以 35% 硫酸铵级分抑制最明显, 说明沙田柚花柱蛋白提取物中存在一种抑制自交花粉管生长的物质, 此物质并不抑制异源花粉管生长。其结果与薛妙男等^[2]沙田柚截面授粉及 Dickison 等^[6]和 Jahmen 等^[10]花烟草分离 S 糖蛋白对花粉管生长抑制影响相一致。

(3) 从表 1 和表 2 中看出, 表 2 中花粉在花柱蛋白提取液中的萌发率比表 1 萌发介质低, 主要原因是表 1 中所用花粉采自盛花期, 而表 2 所用花粉采自开花后期。再者在花柱蛋白提取液中可能杂有不利于花粉萌发的物质。

(4) 我们试图从花柱中分离花粉管, 由于沙田柚花柱的花柱道为实心, 数量为 12~16 条, 花粉管是在通道细胞纤维果胶壁中通过, 很难从中分离出来。所以采用离体培养和花柱切面授粉的方式, 可以收集到一定数量的花粉管, 供研究花粉 S 基因蛋白之用。

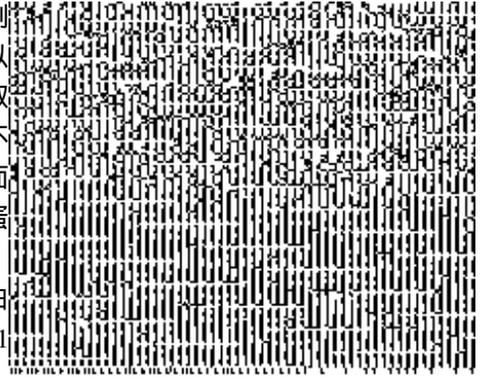


图 5 沙田柚花粉管从柱头相对一端花柱的 1/4 切口处伸出

Fig. 5 The pollen tubes of shatianyu were out of the 1/4 stylar section opposing to the stigma

参考文献

- 1 陈劲春. 植物生殖生物学研究的一些进展. 植物生理学通讯, 1996, 32 (1);
- 2 薛妙男, 陈腾士, 杨继华. 沙田柚自交和异交亲和性观察. 园艺学报, 1995, 22 (2): 127~132
- 3 李楠, 张杏辉, 薛妙男. 沙田柚柱头表面结构及花粉管进入柱头细胞的研究. 广西师范大学学报(理科版), 1995, 13 (4): 76~82
- 4 杨中汉, 陈良甫, 曹宗巽. 用免疫亲和层析和 ELISA 测定百合花粉萌发过程中细胞分裂含量的变化. 植物学报, 1994, 36 (6): 430~436
- 5 Brothaerts W, et al. Petunia hybrida S- proteins rilonuclease activity and the role of their glycan side chains in self-incompatibility. *Sex plant Reprod*, 1991, 4: 258~266
- 6 Dickinson H G, et al. Pollen-pistil interaction in *Lilium longiflorum*; the role of the pistil in controlling pollen tube growth following cross- and self-pollinations. *Proc. R. Soc. London Ser- B*, 1982, 215: 45~62
- 7 Doughty J, et al. interaction between a coatingbome peptide the Brassica pollen grain and stigmatic (self-incompatibility) -bcus-specific glycoproteins. *Proc Acad. Sci*, 1993, 90: 467~471
- 8 Gauda T, Dumas C. Pollen-stigma interactions and S-products in Brassica. In "Biotechnology and ecology of pollen". Springer-Verlag, 1986, 209~211
- 9 Heslop-Hauisor J. Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in the grasses. *Science* 1982, 215: 1358~1364
- 10 Jahene W, Batterham MP, Clarke AE, et al. Inhibition of pollen tube growth by isolated S-glycoproteins of *Nicotiana glauca*. *Plant cell*, 1989, 1: 501~510