

芸苔属植物自交不亲和性及其机理研究进展*

汤青林 宋明 王小佳

(西南农业大学园艺系 重庆 400716)

摘要 自交不亲和性广泛存在于芸苔属植物当中,有着防止自交衰退等作用,在育种工作中意义重大。本文综述了芸苔属植物自交不亲和性及其表现,自交不亲和内在机制,如S复等位基因及相互作用,S位点糖蛋白,S多基因家族,S位点受体激酶,蛋白质可逆磷酸化等。

关键词 芸苔属植物 自交不亲和 S位点糖蛋白 S位点受体激酶 蛋白质磷酸化 信号转导

自交不亲和性(Self-incompatibility,SI)是指雌雄二性配子均有正常生活受精能力,在不同基因型的株间授粉能正常结子,但花期自交不能结籽或结籽率极低的特性。几乎一半以上的显花植物涉及70多个科,250个属具有自交不亲和性(de Nettancour,1977)。Takahata(1980)研究了十字花科芸苔属(*Brassica*)及其近缘野生种组成的芸苔族(*Brassicaceae*),在其59类植物中,有50类是自交不亲和的^[1]。自交不亲和性是大多数高等植物防止近亲繁殖的一种遗传屏障,它主要用于原种的保留和F₁杂种的生产。自交不亲和性即使不用于杂种生产,育种家也需要知道自己育种材料的亲和特性,以便自花授粉和回交。目前普遍认为:自交不亲和性由S基因控制,当雌雄性器官具有相同的S基因时,交配不亲和,雌雄双方的S基因不同时交配能亲和。

从形态上可将自交不亲和划分成异型(heteromorphic)和同型(homomorphic)两类。前一类中,植物间亲和与否,可据各种基因型植株具有的不同花的形态判断。后一类中,花的形态特征和亲和性无关。同型自交不亲和性又分成孢子体型自交不亲和性(Sporophytic self-incompatibility,SSI)和配子体型自交不亲和性(gametophytic self-incompatibility,GSI)。SSI大多数为单基因控制,如十字花科、菊科中绝大多数植物。少数为多基因控制(如芝麻);GSI中茄科、豆科为单基因控制,禾木科为双基因控制,也有多基因控制的,如甜菜为四基因控制。

芸苔属植物是SSI型,目前,对SSI的研究,主要集中在芸苔属植物中。芸苔属植物亲和与否取决于产生花粉的父本营养体而非花粉本身是否具有与雌

蕊相同的S基因。其自交不亲和性在遗传上由具有复等位基因的单基因位点S位点(S代表不亲和性Sterility)控制。本文就芸苔属植物的自交不亲和性进行了综述。

1 自交不亲和性的表现

一般而言,植物自交不亲和性无外乎四种表现形式:花粉在柱头上不能正常萌发;花粉萌发后花粉管不能进入柱头;花粉管进入柱头后,在花柱中不能继续延伸;花粉管到达胚囊后精卵不能结合。GSI具有双核花粉和湿性柱头,自体花粉经过萌发和初期生长后,在花柱组织中被抑制。而芸苔属植物是SSI型,与此不同,它具有三核花粉和干性柱头,花粉的抑制作用发生在花粉与柱头作用的初期,自交抑制并非花器形态学上或时间上的障碍,而是花粉与柱头相互作用后,花粉管生长受到抑制而发生。受抑制的部位是柱头表面的胼胝质。其中白菜(*Brassica campestris*)等自交不亲和是花粉在柱头上能萌发,但不能穿透柱头乳突细胞;而甘蓝(*Brassica oleracea*)等,花粉在柱头上不能正常萌发,花粉与柱头接触后,花粉和乳突细胞胼胝质(callose)不断积累。因此有人认为:胼胝质的多少是芸苔属植物亲和与否的标志之一。不亲和时,乳突细胞沉积大量的胼胝质,亲和时没有或很少有胼胝质的积累,自交不亲和性对花粉而言,控制自交不亲和的S基因在花药中表现,然后基因产物再转移到花粉上;对于柱头而言,S基因产物在花前2天左右迅速积累,表现自交不亲和性,因此开花前2天或更早的柱头不能区分自体或异体花粉,能实现自体受精。

国家自然科学基金资助项目。

2 自交不亲和性的机理

2.1 生理机制

关于自交不亲和性的生理机制有多种假说,最具代表性的是免疫学说、乳突隔离假说以及角质酶假说等。

免疫学认为:植物柱头和花粉管具有相同的基因型时,会产生“抗原—抗体”系统。表现不亲和时,从花粉管分泌出“抗原”,刺激花柱组织形成抗体,从而阻止花粉管的伸长。乳突隔离假说则认为:柱头的表皮层具有乳突细胞,外面覆盖有角质层,它可能是自交不亲和植物阻止花粉萌发的物质。此外,克赖斯特(christ)以角质酶假说解释自交不亲和性,认为花粉的角质酶在不亲和的柱头上失活,而亲和的柱头可活化角质酶,被激活的角质酶使柱头角质层水解而有利于花粉管的生长。Linsken等在萌发的花粉中发现角质酶而支持这一假说^[2]。

2.2 S 复等位基因

芸苔属植物 SI 受单基因位点(S 位点)控制,在这个 S 位点上有多个等位基因,复等位基因之间存在复杂的相互关系,使 SSI 型有独特的遗传规律。目前已发现芸苔属中至少有 60 多个等位基因,仅在甘蓝中就有 50 多个(Ockendon,1974,1982)。

Thompson(1957)发现 SSI 型杂合 S 基因间在雌蕊和雄蕊上均有两种关系,即独立和显隐关系,在以后的芸苔属植物中如孢子甘蓝(Thompson 等,1965),花椰菜(Thompson,1966)等多种植物上证实了这一观点。独立是指杂合的两个不同等位基因分别独立起作用,互不干扰,只要亲本孢子体细胞中具有一个或两个相同的 S 基因,就会引起 SI 反应。显隐就是两个不同等位基因中只有一个有活性,另一个基因完全或部分沉默。但是不同芸苔属植物其复等位基因的数量差异较大,在花茎甘蓝上估计有 7 个(Odland,1962),而在羽衣甘蓝上至少有 40 个(Thompson 等,1966)。进一步研究表明,杂合的 S 基因间还存在着显性颠倒和竞争减弱现象,显性颠倒是指在花粉中, S_x 对 S_y 为显性,但在花柱中, S_x 对 S_y 为隐性,竞争减弱是指两基因的作用相互干扰而使不亲和性减弱或甚至变为亲和。S 复等位基因复杂的相互关系,使亲代之间,亲代与子代之间有着特殊的亲和关系,例如,由于双亲(母本和父本)有显性颠倒,因此存在正反交亲和差异。现在,一般将 S 等位基因纯合体分成两类^[3]:即 类 S 等位基因纯合体(显性 S 等位基因纯合体)和 类 S 等位基因纯合体(隐性 S

等位基因纯合体)。前者 SI 表型较强,如甘蓝纯合系中 S_6 、 S_{14} 、 S_{22} 等,每个自花授粉的柱头花粉萌发数为 0~10 个;后者 SI 表型较弱,如甘蓝纯合系中 S_2 、 S_5 和 S_{15} 等,每个自花授粉的柱头上花粉管萌发数为 10~30 个。

2.3 S 位点糖蛋白

60~70 年代,生物免疫化学研究表明:芸苔属柱头乳突细胞的主要蛋白质成分是一种碱性糖蛋白,即 S 位点特异糖蛋白(S-locus specific glycoprotein,SSG)。又称 S 位点糖蛋白(S-locus glycoprotein,SLG)。80 年代中期,克隆了编码这类 SLG 的基因。Nasrallah(1967)对甘蓝柱头中蛋白质研究发现 S 基因总是与 SLG 相偶联。Nishio 和 Hinata(1978),在研究白菜柱头蛋白时,得到同样的结论。王晓佳等(1991)^[4]和刘宝敬等(1998)^[5]利用等电聚焦法对甘蓝 SI 进行鉴定,证明了 SI 甘蓝材料中确实有一种特异的蛋白质,许多实验证明,正是这种蛋白质抑制了花粉的萌发和花粉管的伸长。免疫化学和原位分子杂交表明(Sedgley,1974):SLG 既不存在于芸苔属植物的叶和根等营养组织中,也不存在于花柱、子房和苗中,而是在成熟柱头乳突细胞的细胞壁上大量积累。SLG 的表达时间与植物 SI 表达的时间相关。当表现 SI 时,柱头中 SLG 含量可高达柱头总蛋白的 5%(Nasrallah 等,1985)。最近用转基因技术直接证明了 SLG 参与调控 SSI 雌蕊—花柱相互作用。目前已通过农杆菌介导的转化方法,成功地将芸苔属的 SLG 基因引入到同属甘蓝型油菜,甘蓝或白菜中,以及异属的拟南芥甚至普通烟草中(Toriyama 等,1991;Thorsness 等,1991;Kandasamy 等,1990;Nishio 等,1992;Hackett 等,1993)。Lee 等(1994)最近得到了 *Petunia inflata* 的 S 基因产物直接参与自体花粉的识别和抑制的证据,用反义 S_3 基因转化的植株不能抑制自体的 S_3 花粉的生长;用 S_3 基因转化的 S_1S_2 植株却能抑制 S_3 花粉。一般而言,如果要转移有功能的 S 基因,必须同时将来自同一等位的基因的 SLG 和 SRK 基因一并转化,原来 SI 植物,当转入完整的 SLG 基因后,可能因为转基因和体内同源基因表达的相互抑制(co-suppression)作用,反而变成自交亲和的了。

SDS-PAGE 电泳显示(Nasrallah 等,1984),SLG 分子量一般为 55-65 kDa。基因型不同,SLG 分子量有所差异。Nasrallah 等(1989)对 SLG 的氨基酸序列分析表明:其序列总长 436 个氨基酸,N-端 31 个氨基酸构成信号肽,其余 405 个氨基酸形成功能蛋白。

SLG的氨基酸序列分成了三个区域:具有约80%保守性的氨基端(1-181氨基酸),变异幅度较大的中间区域(182-268氨基酸),保守性约为78%的羧基端,其中有11个完全保守的半胱氨酸残基。同时,不同S基因编码的SLG的N-糖化位点确切位置不一样,由此表明:SLG具有分子多样性^[6]。

刘宝敬等(1998)^[7]运用日立835-50型氨基酸自动分析仪测定,采用欧氏距离(Eucliden distances)、单联法(single linkage)聚类分析,发现甘蓝自交不亲和系与亲和性的柱头和花粉氨基酸组成有显著差别,柱头中苏氨酸和酪氨酸含量以及花粉中甘氨酸和丙氨酸含量可以作为评价自交不亲和性的指标。

人们推测,花粉中也应该存在S基因的表达产物,用电泳和免疫学方法在花药和花粉中未检测到SLG,可能是含量甚微的原因。Toriyama(1991)^[8]用更灵敏的核酸探针的方法,从转录水平上证明了SLG在花粉中微弱表达而且时间较短,仅在开花前3-4天减数分裂后期的花药中有微弱杂交带,而减数分裂前的花药及含成熟花粉的花药无杂交带。可能是因为SLG在绒粘层中合成后转移到花粉中(Heslop-Harrison,1975)。

2.4 S多基因家族

芸苔属中有多个基因与SLG的结构基因有联系,目前已发现这一多基因家族至少有6个表达成员:SLG基因^[9],SRK基因^[10],SLR₁^[11],SLR₂^[12]和SLR₃基因^[13],SLA基因^[14]。它们的表达产物不会影响雌雄配子的正常活力,但会造成植物自交结实率低甚至不结实,即通常所说的自交不亲和。

Nasrallah ME等(1967)在甘蓝中发现了SLG基因,这是最早发现的S位点基因。SLG基因编码S位点糖蛋白。SLG基因的表达不是诱导的,而是受严格的发育阶段控制。在植物开花前约2天,编码大量的SLG产物参与SI反应。Lalonde等(1989)分离得到了一种与SLG相关的基因,称为S位点相关基因(S-locus related,SLR),目前已发现三种SLR基因,SLR₁,SLR₂和SLR₃,它们编码与SLG相似的蛋白质,而且在柱头乳突细胞中表达。其蛋白质产物在花粉——柱头识别过程中的作用还不清楚。它们的作用未确定,可能与SI反应无关,因为这些基因都不与S位点紧密连锁。还有一种遗传上与S位点紧密连锁的基因,S受体激酶(S-receptor Kinase,SRK)基因,SRK基因编码一种转运蛋白即S位点受体激酶。SRK基因的多肽产物具有丝氨酸/苏氨酸酶活性。SRK的S-结构域与SLG的S-结构域90%

以上的氨基酸序列是相同的。两者有同源性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,不少实验证明,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶参与了信号传递与自交不亲和性有关,此外,在甘蓝中还检测到另外一个S基因,即SLA(S-Locus Anther)基因。Pastuglia等(1997)^[15]认为SLA可能不参与SI反应。

S多基因家族的成员可能远不止这些。目前已证明至少有两个基因在柱头乳突细胞中表达,参与SI反应。这两个基因是SLG基因和SRK基因,而其他成员究竟作用如何?是否直接或间接参与SI反应,有待进一步研究。

2.5 蛋白质磷酸化及信号转导

芸苔属自交不亲和识别系统受一个S多基因家族的复等位基因控制,在SI反应中,各个成员紧密配合,调控着这一精细的反应,它们之间是怎样协调作用?信号物质是如何转导?目前仍不十分清楚,只知道SLG基因和SRK基因与S位点紧密连锁,参与SI反应。在S等位基因单倍型自交不亲和类型中均可分离到SLG和SRK(Boyes and Nasrallah,1993;Bores et al,1997)。这两个基因有一个同源区域(SRK内的一个S区域对SLG来说是同源的),而且两者均有高度多态性(Dwyer et al,1991;Hinata et al,1995;Kusaba, et al,1997)。由此表明,它们可能存在某种相互作用关系,它们的作用可能与信号识别功能有关。主要问题是这些区域的哪些部分参与识别作用,是否两个基因均有这样的作用,它们之间的相互作用机理如何?

最近研究表明:芸苔属的SRK基因编码与分泌到柱头表现的SLG有同源性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Stein et al,1991;Gring et al,1992;Stein et al,1993)。SRK主要在雌蕊柱头上表达,在花药中表达微量。SRK是一种具有酶活性的特殊跨膜受体,既不同于离子通道型受体(由多亚基组成受体/离子通道复合体,除本身有信号接受部位外,又是离子通道,其跨膜信号转导无需中间步骤,反应快,一般只需几毫秒),又不同于G蛋白偶联型受体(它们须与G蛋白偶联才产生胞内信使,如cAMP、cGMP、DG、IP₃等,将信号传到胞内)。SRK有胞外受体区,跨膜区和一个胞内激酶区,因此,SRK具有特异配基受体和蛋白激酶的双重功能。它本身是一种具有跨膜结构的酶蛋白,当胞外域与配体结合后,并不是直接产生特殊胞内信使(如cAMP、cGMP、IP₃、DG等),而是激活胞内具有蛋白激酶活性的结构,从而使胞内某些蛋白质的氨基酸残基(如Ser/Thr等)磷酸化^[17]。

SLG的S-结构域与SRK的S-结构域氨基酸序列有90%以上是相同的。SLG基因与SRK基因高度同源性表明:SLG基因可能是SRK基因复制的产物。

自交不亲和实质上是由雌蕊细胞分泌识别物质来认识或拒绝同源花粉的一种分子过程,单一乳突细胞能让亲和的花粉粒萌发,同时又能拒绝不亲和花粉粒。拒绝反应主要发生在乳突细胞中。SRK在该反应的信号传递过程中起核心作用。芸苔属植物自交不亲和反应中很可能在S位点存在一种特殊的花粉粒配体^[18,19]。这一特殊配体可与SRK胞外结构域接合,也可与SLG结合,改变SRK或SLG构象,从而使SLG和SRK结合成二聚体,然后通过跨膜信号传导,激活SRK胞内蛋白激酶结构,使SRK等的Ser和Thr残基发生磷酸化,进而产生磷酸化级联反应,使信号在乳突细胞中传递和放大,最终导致花粉萌发受阻。芸苔属SI反应机理可能有如下^[18,20,21]:

花粉 配体
+ 柱头 SLG·SRK二聚体 Ser/Thr 可逆磷酸化 磷酸化级联反应 细胞反应 抑制花粉萌发
SLG SRK

SRK接受胞外信使,通过跨膜区传到胞内后,很可能会启动一系列下游信号转导途径,研究SRK下游信号传递分子,对深入认识SSI分子机理非常重要。尽管SSI由于蛋白质可逆磷酸化所致这一假说得到大力支持^[21,22],但该反应过程中,靶分子究竟是什么?细胞感受转导环境刺激的分子途径如何?细胞的基因表达及代谢生理反应怎样调控?

目前油菜(*Brassica napus*)中,一种称为THL-1的硫氧还蛋白磷酸化可能是SRK胞内激酶区激活所致^[20]。白菜(*Brassica campestris*)的SI可能与编码水孔蛋白的基因有关^[23]。其过程可能是:白菜自体花粉识别 可逆磷酸化 激活MOD基因 产生MOD蛋白 形成水孔通道 花粉粒水分进入柱头乳突细胞 花粉粒水合作用受阻 抑制花粉萌发。

3 结语

蛋白质可逆磷酸化和胞间信号传导是目前生物学的热点研究领域,也是前沿科学。对它的深入研究,将会以崭新的面貌诠释生命现象。自交不亲和性是植物生命现象中一个重要的组成部分。对SRK作用机理的研究将是解释SI反应的关键入口。尤其是探索它的蛋白质磷酸化级联反应,信号转导途

径以及内在基因调控机理。同时,认识更多的S多基因家族成员和它们之间的协作关系,也会有助于弄清芸苔属植物的自交不亲和性分子机理。

细胞信号转导使正常细胞代谢速率被调节控制在一个十分精密范围内,使得各种物质浓度处于执行功能所需的最适状态,不会因为某些物质的过多堆积或缺乏导致代谢失调,引发生物体病变或死亡。这确实令人惊叹不已。开创性的对SRK胞间信号传导机制研究,必将为利用植物雄性不育和植物自交不亲和性进行杂交种子生产的基因工程奠定理论基础。

自交不亲和反应涉及雌雄双方。目前已对雌蕊上控制SI的应的S基因产物进行了分离和鉴定。尽管有证据证明雄蕊中也存在微量S基因产物,但是对它的分离鉴定仍然存在一定难度。薛勇彪等(1995)认为:至少有三种方法可以分离克隆花粉S基因,即染色体行走法(chromosome walking),异源转座子标记法(heterologous transposon tagging)以及以蛋白质为基础的常规cDNA分离法。对花粉S基因产物的分离鉴定,是弄清芸苔属植物自交不亲和性分子机理又一个突破口。

参考文献

- [1] 孟金陵,刘定富,罗鹏等,植物生殖遗传学,北京:科学出版社,1995:214-295.
- [2] 方瑾,生物学通报,1996,31(7):28-30.
- [3] Nasrallah JB, Nishio T, Nasrallah ME. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1991, 42:393-422.
- [4] 王晓佳,裴炎,杨光伟等,园艺学报,1991,18(1):91-93.
- [5] 宋明,刘宝敬,李成琼等,园艺学报,1998,25(2):194-196.
- [6] Nasrallah JB, Nasrallah ME. *Annu Rev Genet*, 1989, 23:121-139.
- [7] 刘宝敬,宋明,王小佳等,植物学报,1998,(11):1028-1034.
- [8] Toriyama K et al. *Devel Biol*, 1991, 143:427-431.
- [9] Nasrallah ME, Wallace DH. *Heredity*, 1967, 22:519-529.
- [10] Stein J C, Howlett B, Boyes DC, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:8816-8820.
- [11] LaLonde B, Nasrallah ME, Dwyer KD, et al. *Plant Cell*, 1989, 1:249-258.
- [12] Boyes DC, Chen CH, Tantikanjana T, et al. *Genetics*, 1991, 127(1):221-228.
- [13] Cock J M, Stanchev B, Delorme V, et al. *Mol Gen Genet*, 1995, 248:151-161.
- [14] Boyes D C, Nasrallah J B. *Plant Cell*, 1995, T:1283-1294.
- [15] Pastuglia M, Ruffier-chable V, Delorme V et al. *Plant Cell*, 1997, 9:2065-2076.
- [16] 华志明,植物生理学通讯,1999,35(3):251-256.

(下转第10页)

The Development of Using Transgenic Plants as Bioreactor to Produce Foot-and-Mouth Disease Vaccine

Cai Zhi-Qiang Xu Bu-Jin

(Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University Hangzhou 310029)

Abstract The utilization of transgenic plants as bioreactor expressing recombinant proteins to be used as animal experimental vaccine is an attractive and inexpensive alternative to conventional fermentation systems for vaccine production. Foot-and-mouth disease vaccine has been produced through expressing the complete open reading frame coding for FMDV structural protein VP1 in plants and the recombinant VP1 protein (the plant-produced antigen) could be effective at eliciting a significant immune response and maintain its immunogenicity. The article summarize the development of production of FMD vaccine using transgenic plants as bioreactor, characteristic and application foreground.

Key words transgenic plants bioreactor foot-and-mouth disease vaccine

(接第 25 页)

- | | |
|--|---|
| <p>[17] 孙大业, 郭艳林, 马力耕编著. 细胞信号转导, 北京: 科学出版社, 1998 第二版, 33 - 38, 190 - 195.</p> <p>[18] Nasrallah JB, Nasrallah ME. <i>Plant Cell</i>, 1993, 5:1325 - 1335.</p> <p>[19] Doughty J, Hedderson F, McCubbin A et al. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i>, 1993, 90:467 - 471.</p> <p>[20] Hiscock SJ, Kues U, Dickinson HG. <i>Trends Cell Biol</i>, 1996, 6:421 - 428.</p> | <p>[21] 华志明. 植物生理学通讯, 1999, 35(1):77 - 82.</p> <p>[22] Rundel E J, Nasrallah ME, Nasrallah JB. <i>Plant Physiol</i>, 1993, 103:165 - 171.</p> <p>[23] Suzuki G, Watanabe M, Torigama K. <i>Plant Cell Physiol</i>, 1995, 36(7):1273 - 1280.</p> <p>[24] Ikeda S, Nasrallah J B, Dixit R et al. <i>Science</i>, 1997, 276:1564 - 1566.</p> |
|--|---|

Research Advances in Self-incompatibility and its Mechanism of Brassica Plants

Tang Qing-lin Song Ming

(Department of Horticulture, Southwest Agricultural University, Chongqing, 400716, China)

Abstract Self-incompatibility, because of its presence almost in all *Brassica* plants with various degrees of expression, remains of interest in many cases, such as preventing inbreeding depression and promoting outcrossing. Therefore, it plays an important role in breeding programme. This paper summarizes its characters and mechanism through following fields: S multiple alleles, S-locus glycoprotein, S-multi-gene family, S-receptor Kinase and protein phosphorylation.

Key words *Brassica* plants, self-incompatibility, S-locus glycoprotein, S-receptor kinase, protein phosphorylation, signal transduction