

# Spd和 MGBG对黄瓜子房内源多胺和蛋白质组成的影响及与单性结实的关系

陈学好 于杰 徐强 郭绍贵

(扬州大学农学院园艺系, 扬州 225009)

**摘要:** 以黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 单性结实体系 EP-6 与非单性结实体系 ZR-2 为试材, 研究外源亚精胺 (Spd) 和多胺合成抑制剂 MGBG 处理对子房 (幼果) 内源多胺含量和蛋白质组成的影响及其与黄瓜单性结实和幼果发育的关系。结果表明: 花前 2 d 对 ZR-2 不授粉子房施用外源亚精胺能显著提高子房内源亚精胺、精胺与腐胺水平, 促进其单性结实和果实生长, 而花前 2 d 对 EP-6 不授粉子房外源施用 MGBG 则显著降低其子房内源亚精胺和精胺水平, 提高了内源腐胺水平, 导致子房萎蔫。运用 SDS-PAGE 法研究了外源亚精胺和 MGBG 处理后子房中可溶性蛋白质组成的变化, 结果表明: ZR-2 用外源 Spd 处理, 开花当天至花后 3 d 的子房中出现了分子量为 55 kD 与 37 kD 的两种特异蛋白质, 花后 1 d 至花后 3 d 又出现了 88 kD 与 82 kD 两种特异蛋白质; 单性结实体系 EP-6 用 MGBG 处理子房, 开花当天至花后 3 d 出现了 47 kD 与 25 kD 两种特异蛋白质, 引起 85 kD、45 kD 与 10 kD 蛋白质的消失。这些结果表明, 外源多胺和多胺合成抑制剂处理可能是通过改变内源多胺水平和蛋白质合成而影响单性结实和子房 (幼果) 发育。

**关键词:** 黄瓜; 多胺; 特异蛋白质; 单性结实

**中图分类号:** S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 04-0632-06

## Effects of Spd and MGBG on Endogenous Polyamine Levels and Protein Profiles in Ovary and Its Relationship with Parthenocarp of Cucumber

Chen Xuehao, Yu Jie, Xu Qiang, and Guo Shaogui

(Department of Horticulture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The effect of spermidine and polyamine biosynthetic inhibitor MGBG on endogenous polyamine contents and protein profiles of ovary and its correlation with cucumber parthenocarp and ovary development were studied using parthenocarpic line EP-6 and non-parthenocarpic line ZR-2 treated with exogenous spermidine and MGBG. The results were as follows: the exogenous applications of Spd at 1 mmol/L at 2 days before anthesis could significantly increase endogenous Spd, Spm and Put levels in the non-pollinated ovaries of ZR-2 at 2 days after anthesis, and the increasing in fruit length and fresh fruit mass could also be observed, which resulted in parthenocarpic ovary (young fruit) growth in the line ZR-2 when non-pollinated. However, the contents of Spd and Spm in the ovary of EP-6, treated with MGBG, were decreased dramatically, while the content of Put was increased. The growth of fruit length and fresh fruit mass was inhibited, which led to ovary wither. The results suggested that both Spd and Spm promote cucumber parthenocarp and ovary (young fruit) growth. We also studied changes of specific protein profiles during ovary / young fruit development treated with exogenous Spd on ZR-2 and MGBG on EP-6. The results showed that specific proteins of 88 kD, 82 kD, 55 kD and 37 kD were identified in the ovary / young fruit of ZR-2 with exogenous Spd application. Application of polyamine biosynthesis inhibitor MGBG on EP-6 ovary could induce the biosynthesis of specific proteins of 47 kD and 25 kD, but lead to the disappearance of the proteins of 85 kD, 45 kD and 10 kD. Those results indicated that exogenous application of Spd and MGBG might stimulate ovary / young fruit growth and induce parthenocarp by regulating endogenous Spd and Spm levels and inducing the synthesis of some specific proteins.

**Key words:** Cucumber; Polyamine; Specific protein; Parthenocarp

收稿日期: 2005 - 03 - 08; 修回日期: 2005 - 07 - 18

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目 [教外司留 (2005) 55号]

多胺是一种具有生理活性的低分子量脂肪族含氮碱,在高等植物基因表达和蛋白质合成中具有重要作用,对许多植物开花坐果和果实发育具有明显的调节作用。在苹果、甜樱桃、荔枝、柑橘、油橄榄和番茄等多种作物上均有关于外源多胺或多胺合成抑制剂对坐果率和果实发育影响的研究报道<sup>[1-6]</sup>,这些研究均表明,多胺,特别是亚精胺(Spermidine,简称Spd)可以提高坐果率和促进果实发育。多胺代谢与黄瓜单性结实的关系目前尚未见报道。我们对黄瓜单性结实品系EP-6与非单性结实品系ZR-2不同发育时期的子房中内源多胺的分析表明,EP-6在不授粉情况下,子房中含有较高水平的内源多胺,使子房能单性结实;ZR-2在不授粉情况下,子房内源多胺水平则较低,使子房不能单性结实<sup>[7]</sup>。本试验仍以ZR-2和EP-6为试材,用Spd和多胺合成抑制剂(Methylglyoxal-bis-guanyldrazide,简称MGBG)分别对其子房进行外源处理,通过比较分析子房内源多胺水平和蛋白质组成以及果实生长发育的变化,进一步明确多胺对黄瓜单性结实的调控作用及其生化基础,同时也为无虫媒条件下应用外源多胺调控黄瓜单性结实提供理论依据和技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与处理

以黄瓜单性结实品系EP-6和非单性结实品系ZR-2为试材,于2002年4月13日直播于扬州大学蔬菜试验田,地膜覆盖,株行距为25 cm × 60 cm,其余管理同常规栽培。

于5月6日起对EP-6开花前2 d的子房进行MGBG处理:不授粉+MGBG(1 mmol/L)和不授粉+清水对照;对ZR-2开花前2 d的子房进行Spd处理:不授粉+Spd(1 mmol/L)与不授粉+清水对照。采用微型喷射器于傍晚日落后开始处理,处理的子房均位于第5~6节位上,每个子房喷液量约0.5 mL。每处理随机取5个子房,分别于花前1 d,花后0、1、2、3 d测量果实的长度、鲜果质量和内源多胺含量,重复3次,同时取各期子房进行可溶性蛋白质的SDS-PAGE分析。

### 1.2 内源多胺的提取与组分分析

盐酸腐胺、盐酸尸胺、盐酸精胺、盐酸亚精胺和1,6-己二胺均购自美国Sigma公司。丹磺酰氯为Fluka AG, Sep-pak silica短柱为Waters公司产品,其余试剂均为国内分析纯试剂。

取0.5 g样品加2 mL预冷(4℃)的5%的高氯酸匀浆,冰浴放置1 h后,10 000 ×g离心15 min,取上清液500 μL,加500 μL丹磺酰氯丙酮溶液(5 mg/L)和50 μL内标液(0.2 μmol/L),再加2 mL pH 10.0碳酸氢钠饱和溶液,混匀后避光置60℃冰浴中20 min,然后加入100 μL脯氨酸溶液(100 mg/mL)。用4 mL甲苯分两次萃取衍生后的样品液,萃取液经过Sep-pak silica短柱后,再用2 mL甲苯/三乙胺(体积比9/1)淋洗短柱,后用3 mL乙酸乙酯淋洗短柱,收集乙酸乙酯相供HPLC分析。

HPLC检测条件为:柱型为u-Bondapak NH<sub>2</sub> 10 μm,柱大小为3.9 mm × 300 mm;荧光检测激发波长338 nm,发射波长495 nm;流动相为甲苯/氯仿/三乙胺=10/89/1,流速为1.2 mL/min,采用梯度洗脱,柱温20℃。

### 1.3 可溶性蛋白的提取与组分分析

取0.5 g样品加入1 mL提取液(pH 7.2磷酸缓冲液0.1 mol/L + NaCl 0.4 mol/L + PVP 1%),冰浴冷冻研磨呈匀浆,20 000 ×g离心20 min,离心两次,取0.5 mL上清液,加入0.5 mL样品处理液(0.5 mol/L、pH 6.8的Tris-HCl缓冲液6 mL + 1 g SDS + 0.5 g PVP + 20 g蔗糖 + 0.005 g淀粉蓝)沸水浴煮沸3~5 min,放入-20℃冰箱保存备用。

参照颜启传等<sup>[8]</sup>的垂直板SDS-PAGE方法,并加以适当改良,即分离胶与浓缩胶整个电泳过程中条件均为稳压(80~100 V),而不是常规20~30 mA稳流,这样可大大提高电泳速度与蛋白的分辨率,仅1.5 h即可结束电泳,且减少了标准蛋白质的用量。

上述提取液于室温溶解,上样前煮沸3 min,并以20 000 ×g离心30 min,上样量10 μL。采用不

连续胶系统: 分离胶 11%, 缓冲液 pH 8.8; 浓缩胶 3.9%, 缓冲液 pH 6.8。胶板厚 0.75 cm, 电泳条件为 100 V 稳压, 时间约 1.5 h。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色 20 min, 脱色后将蛋白电泳胶片置于固定液中 (甲醇 50 mL + 冰乙酸 75 mL) 保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源多胺与 MGBG 处理对黄瓜子房发育的影响

2.1.1 外源多胺的影响 花前 2 d 用 1 mmol/L Spd 处理 ZR-2 未授粉子房能促进其子房膨大, 即从花前 2 d 至花后 3 d, 外源 Spd 处理的子房其鲜果质量与果长都呈上升趋势。花前 1 d 至花后 2 d, 对照 (未授粉) 与外源 Spd 处理的子房没有明显差异, 都能正常发育, 但以后对照子房鲜果质量与果长开始剧烈下降, 外部形态上呈现不同程度的褐变与僵化, 最终萎蔫化瓜。而外源 Spd 处理的子房则继续膨大, 至花后 3 d, 单果质量与果长分别为对照的 2.54 倍和 1.3 倍 (图 1)。这一结果说明外源 Spd 能促进黄瓜单性结实和果实发育。

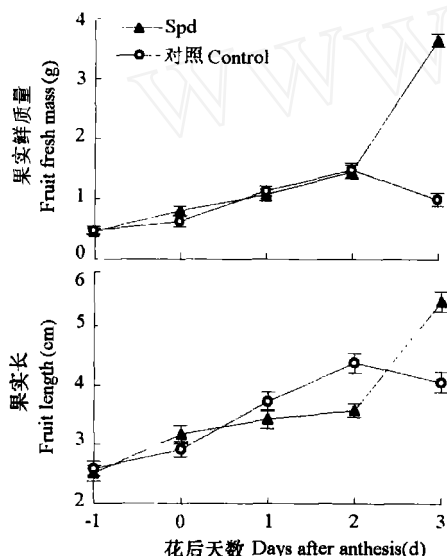


图 1 外源多胺处理对 'ZR-2' 黄瓜子房发育的影响

Fig. 1 Effects of exogenous treatment with Spd on the ovary development of 'ZR-2' cucumber

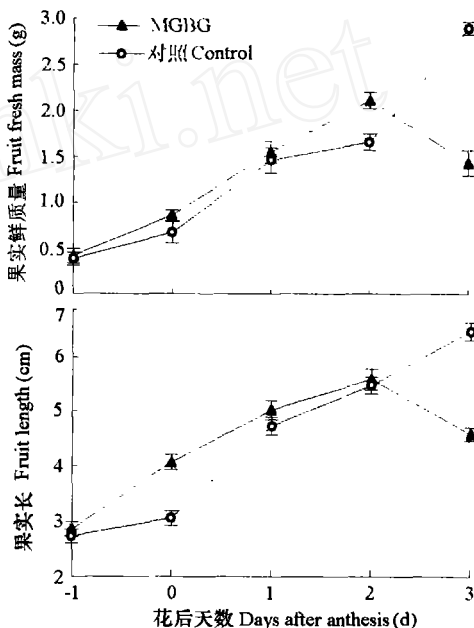


图 2 外源多胺合成抑制剂 MGBG 处理对 'EP-6' 黄瓜子房发育的影响

Fig. 2 Effects of exogenous treatment with MGBG on the ovary development of 'EP-6' cucumber

2.1.2 多胺抑制剂 MGBG 的影响 单性结实品系 EP-6 于花前 2 d 分别用 1 mmol/L MGBG 和清水 (对照) 处理 (两者均通过夹花而避免授粉), 结果表明, 处理与对照子房生长发育存在显著差异, 花前 1 d 至花后 2 d, 子房均能正常膨大, 果长与果实鲜质量也均呈上升趋势, 但花后 2 d 开始, MGBG 处理的果实生长明显受到抑制并最终导致萎蔫化瓜, 呈现与 ZR-2 不授粉处理子房类似的现象; 而对照的子房花后 2 d 仍能正常膨大, 并且果长与果实鲜质量继续呈快速上升趋势 (图 2); 花后 3 d, 对照的子房果实鲜质量与果长分别为 MGBG 处理的 2 倍与 1.4 倍。以上结果说明, MGBG 作为多胺合成抑制剂, 能显著抑制黄瓜单性结实和果实发育。

### 2.2 外源多胺以及合成抑制剂 MGBG 对黄瓜子房内源多胺水平的影响

2.2.1 外源多胺的影响 对非单性结实品系 ZR-2 喷清水 (对照) 和外源亚精胺 (Spd), 分析其子房内源多胺含量的变化, 结果 (图 3) 表明, 二者子房内都含有游离态 Spd、Spm (精胺)、Put (腐胺) 以及 Cad (尸胺) 4 种多胺, 其含量高低顺序为 Spd > Spm > Put > Cad, 其中 Spd 与 Spm 含量显著高于 Put 与 Cad 水平 (因 Cad 含量极低, 数据未列出)。

与对照相比, 外源 Spd 处理促进了内源 Spd、Spm 与 Put 的合成水平, 从而促进黄瓜子房发育。

在花前 1 d至花后 3 d的子房中, 内源 Spd与 Spm含量始终高于对照, 开花当天出现最高峰值, 其含量分别为对照的 1.86倍与 1.85倍。子房内源 Put含量亦显著高于对照, Put在开花前 1 d出现高峰值, 然后逐渐下降, 花后 2 d出现低谷, 然后又剧烈上升; 至花后 3 d, 再次上升, 其含量为对照处理的 2.2倍。外源多胺处理与对照的内源 Cad变化均没有规律性, 相对于 Spd、Spm与 Put而言, Cad在黄瓜子房中含量甚微(数据未列出), 可能对果实发育的影响不大。

2.2.2 多胺合成抑制剂 MGBG的影响 图 4表明, 无论是喷施 MGBG还是清水(对照), 单性结实品系 EP-6子房中内源多胺含量水平顺序也为 Spd > Spm > Put > Cad(因 Cad含量甚微, 故数据未列出)。花前 2 d用 MGBG处理 EP-6未授粉处理的子房, 不仅显著抑制黄瓜果实初始阶段的膨大, 而且能显著降低子房内源 Spd与 Spm的水平, 但提高了 Put的含量。花前 1 d至花后 3 d, MGBG处理的子房其内源 Spd与 Spm含量均低于对照, 至开花当天分别为对照的 60%与 81%。从开花当天至花后 3 d, MGBG处理的子房其内源 Put水平显著高于对照, 前者为后者 1.87倍, 这与 Aziz等<sup>[9]</sup>对葡萄果实的外源多胺合成抑制剂的调控结果相类似。

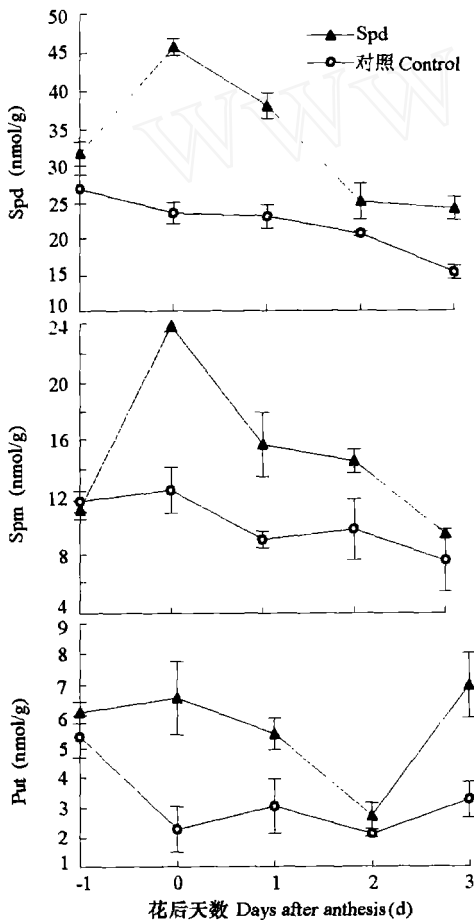


图 3 外源 Spd调控对 'ZR-2' 黄瓜子房(幼果)内源多胺水平的影响

Fig 3 Effects of exogenous treatment with Spd on the endogenous polyamines in ovary/young fruit of 'ZR-2' cucumber

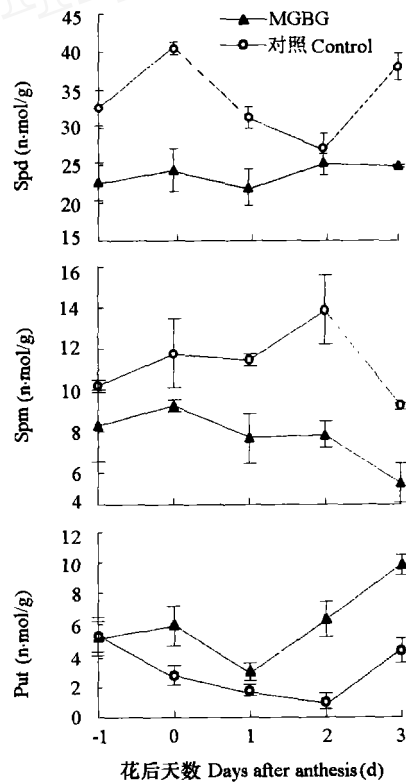


图 4 多胺抑制剂 MGBG对 'EP-6' 黄瓜子房(幼果)内源多胺水平的影响

Fig 4 Effects of exogenous treatment with MGBG on the endogenous polyamines in ovary (young fruit) of 'EP-6' cucumber

### 2.3 黄瓜子房发育过程中蛋白质组成的变化动态

我们把同一品系 Spd或 MGBG处理子房中出现而在对照中不存在的蛋白质称为特异蛋白质。

Spd处理能引起非单性结实品系 ZR-2未授粉子房可溶性蛋白组分的变化, 相对于对照而言, 花前 1 d花后 3 d, 都出现分子量为 55 kD与 37 kD的两种特异蛋白质, 花后 1 d至花后 3 d, 又出现 88 kD与 82 kD两种特异蛋白质; 同时引起 80 kD、26 kD和 22 kD蛋白质消失(图 5)。单性结实品系

EP-6用 MGBG处理子房,在花前 1 d至花后 3 d均出现分子量为 47 kD与 25 kD两种特异蛋白质,同时引起 85 kD和 10 kD的蛋白质消失,花后 1 d至花后 3 d又引起 45 kD蛋白质消失(图 6)。从果实发育的外部形态看, Spd处理后引起子房单性结实;外源喷施 MGBG后抑制了子房膨大而不能单性结实。因此,上述蛋白质合成上的变化可能与子房(幼果)发育趋势密切相关。

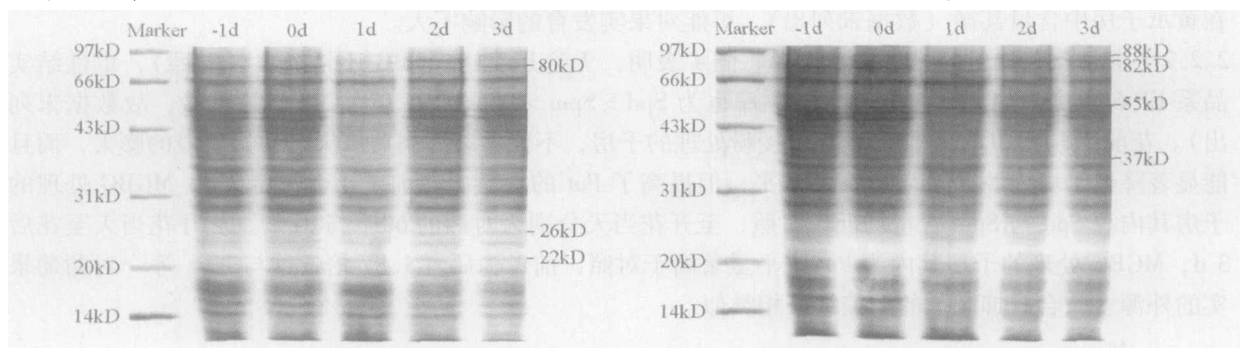


图 5 非单性结实体系‘ZR-2’经 Spd处理合成的特异蛋白质谱带

Fig 5 Specific protein profiles caused by exogenous application with Spd in the ovary/young fruit of non-parthenocarpic line ZR-2 of cucumber

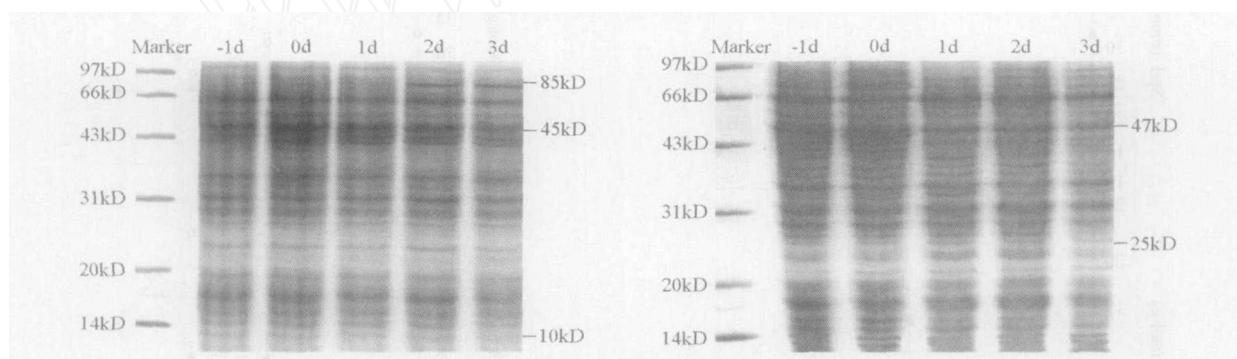


图 6 单性结实体系‘EP-6’经 MGBG处理合成的特异蛋白质谱带

Fig 6 Specific protein profiles caused by exogenous application with MGBG in the ovary/young fruit of parthenocarpic line EP-6 of cucumber

### 3 讨论

大量的研究指出,外源多胺,尤其是 Spd与 Spm能够促进多种作物开花坐果及果实发育<sup>[10~12]</sup>。Peren-Amador等认为,多胺水平的降低常和器官的成长和衰老有关,而 Spd和 Spm的积累则常常和器官的发生和生长有关<sup>[13]</sup>。本研究表明,外源 Spd能显著促进黄瓜非单性结实体系内源多胺尤其是 Spm与 Spd的水平,从而刺激子房初期阶段的膨大;而 MGBG处理单性结实体系黄瓜显著降低了子房内源 Spd与 Spm的水平,抑制子房发育,却提高了内源 Put与 Cad水平,这在烟草<sup>[14]</sup>、小麦<sup>[15]</sup>、番茄<sup>[2]</sup>和豌豆<sup>[16]</sup>等作物上也有类似报道, MGBG通过抑制 SAMDC(S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶)的活性而影响 Spd和 Spm的合成,而 Put的合成则不受影响,使得在 MGBG处理后 Put含量不降反升。这也表明 Put或者并不参与黄瓜单性结实的调控或者调控黄瓜单性结实的机理比较复杂,还需进一步试验研究。

许多研究表明,内源多胺能够参与核酸与蛋白质等生物大分子的代谢过程<sup>[17~20]</sup>,从而促进植物开花坐果与果实初始阶段的发育<sup>[21~23]</sup>。至于外源多胺调控与植物体内可溶性蛋白质的关系则鲜为报道。

本试验通过 SDS-PAGE分析发现,外源 Spd和 MGBG处理不仅诱导黄瓜子房中产生若干特异蛋白质,而且还引起若干蛋白质消失,这可能与黄瓜子房能否单性结实和果实的进一步生长和发育有关。

## 参考文献:

- 1 张秋明, 郑玉生, 魏岳荣, 刘昆玉, 谢深喜. 柑桔多胺代谢及其对生长结果调控的研究. 湖南农业大学学报, 2000, 26 (4): 271 ~ 273  
Zhang Q M, Zheng Y S, Wei Y R, Liu K Y, Xie S X. Studies on polyamine metabolism and its regulation of growth and fruit set in *Citrus*. Journal of Hunan Agricultural University, 2000, 26 (4): 271 ~ 273 (in Chinese)
- 2 Rajeev R, Vipin K, Sawhney M. Polyamines and flower development in the male sterile stamenless-2 mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Physiol, 1990, 93, 446 ~ 452
- 3 任小林, 马锋旺, 王飞. 亚精胺对李果实乙烯的产生和呼吸速率的影响. 植物生理学通讯, 1995, 31 (3): 186 ~ 188  
Ren X L, Ma F W, Wang F. Effect of spermidine on ethylene and respiration of plum. Plant Physiology Communications, 1995, 31 (3): 186 ~ 188 (in Chinese)
- 4 徐继忠, 陈海江, 邵建柱, 袁小乱, 马宝, 章文才. 外源多胺促进红富士苹果花芽形成的效应. 果树科学, 1998, 15 (1): 10 ~ 12  
Xu J Z, Chen H J, Shao J Z, Yuan X L, Ma B K, Zhang W C. Effects of exogenous polyamines on flower bud formation of red Fuji apple variety. Journal of Fruit Sciences, 1998, 15 (1): 10 ~ 12 (in Chinese)
- 5 徐继忠, 陈海江, 马宝, 章文才. 外源多胺对富士苹果花和幼果内源多胺与激素的影响. 园艺学报, 2001, 28 (3): 206 ~ 210  
Xu J Z, Chen H J, Ma B K, Zhang W C. Effects of exogenous spermidine on the levels of endogenous hormones and polyamines in the flowers and fruitlets of red Fuji apple. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28 (3): 206 ~ 210 (in Chinese)
- 6 Costa G. Effect of polyamines on fruit set of apple. HortScience, 1983, 18 (1): 59 ~ 61
- 7 于杰. 黄瓜单性结实与多胺代谢的关系及多胺调控研究. 硕士论文. 扬州: 扬州大学, 2003. 16 ~ 22  
Yu J. Study on the relationship between parthenocarp and polyamines metabolism of cucumber ovary and exogenous regulation with polyamine. [Master Dissertation] Yangzhou: Yangzhou University, 2003. 16 ~ 22 (in Chinese)
- 8 颜启传, 邓光联, 支巨振. 农作物品种电泳鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1998. 44 ~ 50  
Yan Q C, Deng G L, Zhi J Z. Electrophoresis handbook for crop cultivar identification. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1998. 44 ~ 50 (in Chinese)
- 9 Aziz A, Oliver B, Jean-Claude A. Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine. Physiologia Plantarum, 2001, 113: 50 ~ 58
- 10 Ponappa T, Raymond M. Polyamines in normal and auxin-induced strawberry fruit development. Physiologia Plantarum, 1996, 98: 447 ~ 454
- 11 Mitra S K, Sanyal D. Effect of putrescine on fruit setting and fruit development of Lichi. Horticultural Abstracts, 1990, 60 (1): 211 ~ 218
- 12 Anna M B, Sonia S, Costa G, Emidio S, Vanina Z, Stefania B, Patrizia T. Peach (*Prunus persica*) fruit ripening: aminooxyvinylglycine (AVG) and exogenous polyamines affect ethylene emission and flesh firmness. Physiologia Plantarum, 2002, 114: 472 ~ 478
- 13 Perez-Amador M A, Carbonell J, Granell A. Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). Plant Molecular Biology, 1995, 28, 997 ~ 1009
- 14 Slocum R D, Galston A W. In vivo inhibition of polyamine biosynthesis and growth in tobacco ovary tissues. Plant Cell Physiol, 1985, 26: 1519 ~ 1526
- 15 Tiburcio A F, Besford R T, Capeu T, Borrell A, Testillano P S, Risueno M C. Mechanism of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. J. Exp. Bot, 1994, 45: 447 ~ 454
- 16 Apelbaum A, Burgoon A C, Anderson J D, Lieberman M, Ben-Ari M A K. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. Plant Physiol, 1981, 68: 453 ~ 456
- 17 汪沛洪. 植物多胺代谢的酶类与胁迫反应. 植物生理学通讯, 1990, 1: 1 ~ 7  
Wang P H. Enzymes of polyamine metabolism and stress response in plants. Plant Physiology Communications, 1990, 1: 1 ~ 7 (in Chinese)
- 18 郭枫, 唐锡华. 水稻胚与胚乳分化中的内源多胺. 植物生理学报, 1990, 16 (2): 173 ~ 178  
Guo F, Tang X H. Endogenous polyamines in embryo and endosperm in differentiation of rice. Acta Phytophysiological Sinica, 1990, 16 (2): 173 ~ 178 (in Chinese)
- 19 李新利, 唐锡华. 水稻开花授粉前后雌蕊中多胺和核酸及蛋白质含量的变化. 植物生理学通讯, 1997, 33 (2): 88 ~ 90  
Li X L, Tang X H. Changes of polyamines, protein and nucleic acid from rice pistil during pre- and post-fertilization. Plant Physiology Communications, 1997, 33 (2): 88 ~ 90 (in Chinese)
- 20 Walden R, Cordeiro A, Tiburcio A F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. Plant Physiology, 1997, 113: 1009 ~ 1013
- 21 Biass R, Bagin N, Costa G. Endogenous polyamines in apple and their relationship to fruit set and fruit growth. Physiologia Plantarum, 1988, 73: 201 ~ 205
- 22 田长恩, 梁承邨, 黄毓文, 刘鸿先. 油菜细胞质雄性不育系及其保持系花蕾发育过程中的多胺代谢. 作物学报, 1999, 25 (5): 602 ~ 607  
Tian C E, Liang C Y, Huang Y W, Liu H X. Metabolism of polyamine during the development of flower buds in cytoplasmic male sterile line and its maintainer line in *Brassica napus* L. Acta Agronomica Sinica, 1999, 25 (5): 602 ~ 607 (in Chinese)
- 23 Shiozaki S, Ogata T, Horiuchi S. Endogenous polyamines in pericarp and seed of the grape berry during development and ripening. Scientia Horticulturae, 2000, 83: 33 ~ 41