

# 利用蛋白激酶抑制剂和激活剂调控甘蓝自交不亲和性

吕俊 朱利泉 王小佳\*

(西南农业大学农学与生命科学学院, 重庆 400716)

**摘要:** 利用蛋白激酶抑制剂 (槲皮素) 和蛋白激酶激活剂 (佛波酯) 分别对甘蓝自交不亲和系与自交亲和系花蕾进行田间处理。结果表明, 槲皮素处理后的自交不亲和系的自交亲和指数与对照相比有所提高, 甚至转变为自交亲和系; 而佛波酯处理后的自交亲和系的自交亲和指数与对照相比有所降低, 甚至转变为自交不亲和系。差异显著性测验结果表明处理与对照之间在结莢率和自交亲和指数上均有显著差异。这为化学调控自交不亲和性提供了新方法。

**关键词:** 甘蓝; 自交不亲和性; 蛋白激酶抑制剂; 蛋白激酶激活剂

中图分类号: S 635; S 603 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 03-0235-05

十字花科蔬菜作物甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 的杂种优势很明显, 生产上应用很广。其杂交种子当前主要利用甘蓝自交不亲和系 (Self incompatible line, SI) 之间的互配而得。利用自交不亲和系配制甘蓝杂种遇到的主要问题之一是繁殖自交不亲和系需进行蕾期授粉, 费时费工, 大大增加了制种成本。为了在授粉期间从生理上降低自交不亲和性, 以利于繁殖和保存自交不亲和系, 国内外已进行了一些研究, 如电助授粉、提高 CO<sub>2</sub> 浓度处理和用 NaCl 溶液处理等。这些方法虽有一定的效果, 但不是太烦琐, 就是易引起药害<sup>[1]</sup>, 至今未找到一个理想的方法。近年来的研究表明, 甘蓝自交不亲和性是通过 S- 受体激酶 (S receptor kinase, SRK) 所控制的蛋白质磷酸化作用来实现的<sup>[2,3]</sup>。本研究试图在其分子机理研究的基础上, 以施用蛋白激酶抑制剂 (槲皮素) 和激活剂 (佛波酯) 的途径找到化学调控甘蓝自交不亲和性的新方法。通过降低或提高蛋白激酶活性, 阻止或促进自交不亲和反应的信号传导, 从而达到调控甘蓝自交不亲和性的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

甘蓝选用西南农业大学多年自交稳定的自交不亲和系 00-62 (亲和指数接近 0) 和 00-A (亲和指数已稳定为 0), 自交亲和系 00-82 (亲和指数明显大于 1)。槲皮素 (quercetin) 和佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 均购自 Sigma 公司。

收稿日期: 2000-12-22; 修回日期: 2001-04-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (399790516)

1.2 方法

蛋白激酶抑制剂处理：分别选取健壮均一的甘蓝自交不亲和系 00-62、00 A 材料各 5 株，每株选取邻近顶花的 3 个花枝上的全部花蕾用槲皮素 500  $\mu\text{mol/L}$  处理<sup>[4,5]</sup>，同时以每株甘蓝的相同位置的 3 个花枝上的花蕾以及顶花分别作为对照，人工花期授粉测定其自交亲和指数。

蛋白激酶激活剂处理：同时选取健壮均一的甘蓝自交亲和系 00-82 材料 5 株，每株同样选择邻近顶花 3 个花枝上的全部花蕾进行佛波酯 1  $\text{mg/L}$  处理<sup>[6]</sup>，对照处理方法同上。

以上处理均在开花前 2 周进行，每隔 1 d 于当日下午 18:30 喷洒处理 1 次，共喷洒处理 5 次，种子成熟后精确统计各种处理花朵的结荚数和结籽数，并计算相应的亲和指数（结籽数/授粉花数）。

2 结果与分析

2.1 甘蓝自交不亲和系 00-62 的结实情况

从表 1 看出，利用槲皮素处理后各株的自交亲和指数与对照相比均明显提高，而且都从小于 1 提高到大于 1，按照亲和指数为 1 作为划分自交不亲和系与自交亲和系的标准<sup>[7]</sup>，即由自交不亲和系转变成成为自交亲和系。亲和指数提高的倍数差异可能与各株的基因型有关，也可能与槲皮素到达柱头乳突细胞的量的多少有关。

表 1 槲皮素（500  $\mu\text{mol/L}$ ）处理甘蓝自交不亲和系 00-62 的效果  
Table 1 The effect of quercetin on self incompatible line 00-62

自交不亲和系 SI line	处 理 Treatment	授 粉 花 数 No. of pollination flowers	结荚数 No. of legumen	种子数 No. of seeds	结 荚 率 Rate of legumen (%)	自交亲和指数 Self compatible index
00-62-1	顶花对照 Top flower control	29	15	1	51.7	0.034
	同位对照 Corresponding flower control	26	14	0	53.8	0
	槲皮素处理 Quercetin treatment	35	20	52	57.1	1.49
00-62-2	顶花对照 Top flower control	30	16	1	53.3	0.033
	同位对照 Corresponding flower control	28	13	0	46.4	0
	槲皮素处理 Quercetin treatment	36	29	136	80.6	3.78
00-62-3	顶花对照 Top flower control	43	22	2	51.2	0.047
	同位对照 Corresponding flower control	32	15	1	46.9	0.031
	槲皮素处理 Quercetin treatment	23	23	83	100	3.61
00-62-4	顶花对照 Top flower control	32	17	1	53.1	0.031
	同位对照 Corresponding flower control	27	12	1	44.4	0.037
	槲皮素处理 Quercetin treatment	41	41	377	100	9.20
00-62-5	顶花对照 Top flower control	38	20	1	52.6	0.026
	同位对照 Corresponding flower control	34	14	1	41.1	0.029
	槲皮素处理 Quercetin treatment	35	32	123	91.4	3.51

2.2 甘蓝自交不亲和系 00-A 的结实情况

从表 2 中发现，比 00-62 株系亲和指数更低且更稳定的 00-A 各株经槲皮素处理后亲和指数略有上升趋势，且各株处理花枝上都有种子，但不同于 00-62 那样亲和指数大幅上升。亲和指数在各株之间的差异原因除了可能与基因型和槲皮素到达乳突细胞的量有关外，还有可能是强自交不亲和系中的 SRK 活性太强和本试验用槲皮素浓度相对较低的缘故。

表2 槲皮素 (500 μmol/L) 处理甘蓝自交不亲和系 00 A 的效果

Table 2 The effect of quercetin on self incompatible line 00 A

自交不亲和系 SI line	处 理 Treatment	授 粉 花 数 No. of pollination flowers	结荚数 No. of legumen	种子数 No. of seeds	结 荚 率 Rate of legumen ( % )	自交亲和指数 Self compatible index
00 A-1	顶花对照 Top flower control	35	29	0	82.9	0
	同位对照 Corresponding flower control	30	20	0	66.6	0
	槲皮素处理 Quercetin treatment	37	37	10	100	0.27
00 A-2	顶花对照 Top flower control	36	25	0	69.4	0
	同位对照 Corresponding flower control	28	19	0	67.9	0
	槲皮素处理 Quercetin treatment	42	39	31	92.9	0.74
00 A-3	顶花对照 Top flower control	30	24	0	80	0
	同位对照 Corresponding flower control	29	21	0	72.4	0
	槲皮素处理 Quercetin treatment	27	27	10	100	0.37
00 A-4	顶花对照 Top flower control	35	26	0	74.3	0
	同位对照 Corresponding flower control	31	22	0	70.9	0
	槲皮素处理 Quercetin treatment	29	29	17	100	0.59
00 A-5	顶花对照 Top flower control	30	21	0	70	0
	同位对照 Corresponding flower control	27	19	0	70.3	0
	槲皮素处理 Quercetin treatment	28	28	20	100	0.71

2.3 甘蓝自交亲和系 00-82 的结实情况

从表 3 数据可看出，利用佛波酯处理后降低了各株的自交亲和指数，亲和指数降低倍数差异的原因可能是由于该材料种植在大棚外，受到一定的外界条件影响。如果用亲和指数大小为 1 作为划分自交亲和系与不亲和系的标准<sup>[7]</sup>，则在试验数据上使全部 5 株中的 3 株由自交亲和系转变成为自交不亲和系。如果扣除外界条件的影响，则有可能将亲和指数为 1.03 的 82-1 株纳入自交不亲和系；那么则可以认为，佛波酯可有效地将具有一定亲和

表3 佛波酯 (1 mg/L) 处理甘蓝自交亲和系 00 82 的效果

Table 3 The effect of Phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA) on self compatible line 00 82

自交亲和系 SC line	处 理 Treatment	授 粉 花 数 No. of pollination flowers	结荚数 No. of legumen	种子数 No. of seeds	结 荚 率 Rate of legumen ( % )	自交亲和指数 Self compatible index
00 82-1	顶花对照 Top flower control	30	24	74	80	2.47
	同位对照 Corresponding flower control	30	26	77	86.7	2.57
	佛波酯处理 PMA treatment	31	21	32	67.7	1.03
00 82-2	顶花对照 Top flower control	35	28	48	80	1.37
	同位对照 Corresponding flower control	29	25	59	86.2	2.03
	佛波酯处理 PMA treatment	30	18	8	60.0	0.267
00 82-3	顶花对照 Top flower control	33	33	122	100	3.70
	同位对照 Corresponding flower control	31	28	110	90.3	3.55
	佛波酯处理 PMA treatment	30	25	21	83.3	0.70
00 82-4	顶花对照 Top flower control	27	27	75	100	2.78
	同位对照 Corresponding flower control	29	28	76	96.6	2.61
	佛波酯处理 PMA treatment	38	26	69	68.4	1.82
00 82-5	顶花对照 Top flower control	36	34	108	94.4	3.0
	同位对照 Corresponding flower control	32	29	91	90.6	2.84
	佛波酯处理 PMA treatment	30	22	27	73.3	0.90

指数的甘蓝自交亲和系转变为自交不亲和系。这尚需进一步研究确证。

## 2.4 槲皮素和佛波酯作用效果的对照评价

在育种上, 顶花授粉有时可代替蕾期授粉来繁殖和延存自交不亲和系, 其原因是顶花比同位花的亲和指数高。因此, 我们认为以前在甘蓝常规育种中单用顶花亲和指数作对照的试验是不严格的。为确保试验结果的可靠, 本研究同时引用了原始记录中的顶花和同位花亲和指数作对照。如果单用顶花亲和指数作对照, 对于抑制剂处理来讲, 由于其结果是增大亲和指数<sup>[8]</sup>, 此种单一对照的严谨性较高; 对于激活剂处理来讲, 由于其结果减少亲和指数<sup>[8]</sup>, 此种单一对照反差过大。而加入同位花对照可纠正此两种的误差。

本试验的数据表明顶花的自交亲和指数略高于相同位置的对照的亲和指数, 槲皮素处理的花枝的亲和指数比顶花对照还高。将抑制剂槲皮素处理的自交不亲和系 00-62 和 00-A 两株系及用激活剂佛波酯处理的自交亲和系 00-82 株系的试验数据进行成对数据差异显著性测验, 结果无论是以顶花作对照, 还是以相同位置的花枝上的花作对照, 在显著水平  $\alpha = 0.05$  时, 处理与对照之间的自交亲和指数均有显著差异。

因此, 同位花对照所纠正的顶花对照的误差, 在显著水平  $\alpha = 0.05$  时表现不出来。在常规育种中用其中任一种作对照均可。

## 3 讨论

甘蓝的自交不亲和性受 S 位点控制。研究表明, S 位点上的 *SRK* 基因编码的受体蛋白激酶在甘蓝自交不亲和反应中起重要作用<sup>[8]</sup>。在分离鉴定了甘蓝柱头 S 位点上决定其自交不亲和反应的两个基因 *SLG* (S-Locus Glycoprotein)<sup>[9]</sup> 基因和 *SRK*<sup>[10]</sup> 基因以后, 芸薹属植物自交不亲和反应的机理被认为是花粉粒中的配体和蛋白激酶 SRK 和 SLG 的复合物结合后, 改变了此复合物的构象, 使 SRK 的胞内 Ser/Thr 蛋白激酶结构域催化蛋白质发生磷酸化/去磷酸化反应, 从而把胞外信号传递至胞内, 引起一系列的细胞反应<sup>[11,12]</sup>, 最终使花粉粒萌发受到抑制, 从而导致自交不亲和性。本试验采用了调节蛋白激酶活性的方法来化学控制自交不亲和性, 使主宰信号传导的 SRK 成为一个调控自交不亲和性的开关: 抑制蛋白激酶活性就关闭了自交不亲和性的信号传导, 从而使自交不亲和性受阻, 造成亲和指数上升; 激活 SRK 活性就促进了 SRK 介导的信号传导反应, 有助于加强自交不亲和反应。按照这个观点, 我们根据相关的生物化学原理, 精心选配了槲皮素 (表 1 和表 2) 和佛波酯 (表 3) 进行田间试验, 取得了与预期趋势相符合的结果: 槲皮素使甘蓝自交亲和指数明显上升, 将自交不亲和系变为了自交亲和系; 而佛波酯则相反, 效果显著。因为这种方法是建立在自交不亲和反应的分子机理上, 所以具有施用量少、反应灵敏的特点。这样不仅找到了一种调控自交不亲和性的新方法, 很有可能为甘蓝等十字花科作物种提供繁殖其亲本的简便途径, 而且还从实践上为自交不亲和性分子机理中的胞间受体激酶信号传导机制提供了直接证据。

## 参考文献:

- 1 杨 锐, 徐阳俊, 徐家炳, 等. 花期喷盐水结合蜜蜂授粉克服大白菜自交不亲和试验. 华北农学报, 1995, 10

- 2 朱利泉, 王小佳. 植物 S 基因家族表达成员研究进展. 西南师范大学学报, 1997, 22 (4): 476~ 480
- 3 华志明. 植物自交不亲和分子机理研究的一些进展. 植物生理学通讯, 1999, 35 (1): 77~ 82
- 4 杨洪强, 贾文锁, 张文鹏. 失水对苹果新根 ABA 含量和蛋白激酶活性的影响. 园艺学报, 2000, 27 (2): 79~ 84
- 5 康铁邦, 黄 才, 梁念慈. 槲皮素对大鼠肝酪蛋白激酶 II 的抑制作用. 生物化学杂志, 1996, 12 (3): 322~ 325
- 6 陈军松, 柴敏强, 宋建国. 佛波酯对 A-549 细胞株中蛋白激酶 C 的调节. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32 (6): 645~ 648
- 7 方智远, 孙培田, 刘玉梅. 甘蓝杂种优势利用的几个问题. 中国农业科学, 1983, 3: 51~ 61
- 8 Nasrallah J B, Nasrallah M E. Pollen-stigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. Plant Cell, 1993, 5: 1325~ 1335
- 9 Nasrallah J B, Kao T H, Goldberg M L, et al. A cDNA clone encoding an S locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea* L. Nature, 1985, 318: 263~ 267
- 10 Stein J C, Nasrallah J B. A plant receptor like gene, the S locus receptor kinase of *Brassica oleracea* L. encodes a functional serine/threonine kinase. Plant Physiol., 1993, 101: 1103~ 1106
- 11 华志明. 植物体中类受体蛋白激酶. 植物生理学通讯, 1999, 35 (1): 251~ 256
- 12 Hicok S J, Kues L L, Dickinson H G. Molecular mechanisms of self-incompatibility in flowering plants and fungi different means to the same end. Trend Cell Biol., 1996, 6: 421~ 428

## A Study on the Regulating Self-incompatibility of *Brassica oleracea* L. by Inhibitor or Activator of Protein Kinase

LüJun, Zhu Liqun, and Wang Xiaojia

(Department of Agronomy and Bioscience, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

**Abstract:** A study on regulating self-incompatibility of *Brassica oleracea* L. by inhibitor (quercetin) or activator (PMA) of protein kinase was conducted. The result showed that the quercetin increased the index of self-compatibility, even turned the self-incompatible line to self-compatible line; PMA reduces the index of self-compatibility, even turned the self-compatible line to self-incompatible line. This is a new method for regulating the self-incompatibility of cabbage.

**Key words:** *Brassica oleracea* L.; Self-incompatibility; Protein kinase inhibitor; Protein kinase activator

### 信 息

## 中国园艺学会采后科学与技术分会成立

“中国园艺学会采后科学与技术分会成立大会暨学术研讨”于 2001 年 5 月 15 日在中国农业大学举行, 学会的主要领导及来自全国 20 多个单位的代表参加了会议, 罗云波、陈昆松、田世平、屈冬玉、陈淮信等作了学术报告, 代表们就分会的章程及工作计划进行了讨论。

## 2000~ 2001 年全国西瓜优质早熟新品种展评总结发布会在京召开

此次展评活动由农业部全国农业技术推广服务中心和中国园艺学会主持。经 2000 年和 2001 年两年田间及瓜的品质评比, 从 15 个参评品种中评出 6 个优质早熟新品种。展评总结会于 2001 年 6 月 2 日在中国农业科学院蔬菜花卉所召开。