

小分子热激蛋白基因在番茄花药中的转录

刘 箭¹ 庄野真理子²

(¹ 山东师范大学生物系, 济南 250000; ² 日本国际农业科学研究中心, 日本石垣市 907)

摘 要: 选择 8 个耐热性不同的番茄品种种植在地处亚热带的日本最南部石垣市, 测定夏季高温环境下花粉粒的败育率, 并据此将其分成耐热型和热敏型品种, 分析高温胁迫下花药中 4 类小分子热激蛋白的转录。结果表明, 番茄花药中含有组成性的细胞质小分子热激蛋白和线粒体小分子热激蛋白 mRNA; 高温季节细胞质小分子热激蛋白和线粒体小分子热激蛋白基因转录明显; 热敏型番茄花药中小分子热激蛋白基因的转录高峰温度低于耐热型花药。

关键词: 小分子热激蛋白; 花粉; 败育; 高温胁迫; 番茄; 花药

中图分类号: S 641. 2; Q 785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 02-0403-04

花是植物对高温胁迫最敏感的器官。植物经轻度热激后, 营养组织通常不会出现明显的伤害症状, 但花粉和子房的败育却十分明显¹², 高温胁迫导致花粉粒败育是热带和亚热带地区蔬菜等作物减产的重要原因之一。遇高温胁迫时, 植物细胞在分子水平上最突出的反应是热激蛋白的表达, 其中小分子热激蛋白 (sHSP) 是主要热激表达产物, sHSP 可以减缓蛋白质的热变性, 并促进热变性蛋白的复性¹², 所以 sHSP 被认为是提高植物细胞抗热能力的重要原因之一^{13,42}。根据 sHSP 在细胞内的分布, 将其分成 5 类, 即定位细胞质的 Class I 和 Class II、定位线粒体的 Class MF、定位内质网的 Class ER 和定位叶绿体的 Class CP sHSP¹², 除 Class CP sHSP 以外, 其它 4 类 sHSP 都可在植物花药中表达。与丰富的大分子热激蛋白研究资料相比, 植物花药中 sHSP 的研究资料相对较少, 虽然已经发现发育的花粉小孢子有组成性表达的 Class I 和 Class II sHSP^{15,62}, 但还缺少 sHSP 在花药中表达的系统研究, 更不清楚花药中表达的 sHSP 是否可以减少花粉粒的高温败育率。作者以番茄为试材, 对此进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用 8 个番茄品种, - 桃太郎. 和 - Suncherry. 为日本品种, - 红毛茄. 为泰国品种, - CLN2026E. 、- CLN2026C. 与 - UC204A. 由亚洲蔬菜研究与发展中心 (台湾省) 提供, - 毛粉. 与 - 西粉. 为中国品种。3 月 15 日将番茄栽培于地处亚热带的日本最南部石垣市, 整个栽培区覆盖塑料大棚, 模拟高温胁迫环境, 气温由电子仪器记录。从 5 月 1 日 (初花) 到 7 月 23 日 (进入当地的高温季节) 分 7 次测定花粉粒的可育率, 7 月 23 日 6、10 和 14 时采集花药, 分析夏季白天气温上升过程中花药中 sHSP mRNA 的累积。

1.2 花粉粒可育性测定

取开花前的花药，放入固定液（乙酸B乙醇为 3B1）中固定，做简易压片，用乙酸洋红染色，染色的花粉粒为可育。

1.3 sHSP mRNA 的 Northern 杂交分析

1.3.1 RNA 的纯化和 cDNA 探针的制备 摘取四分体时期的花药，在液氮中研成粉末，加入 1.2 倍体积的变性缓冲液 1 异硫氰酸胍 4 mol/L，柠檬酸钠 26 mmol/L (pH 4.0)，N2 laurylascosine 0.5%，巯基乙醇 0.125 mol/L2，再加入相当于变性缓冲液 1/10 体积的醋酸钠 2 mol/L (pH 4.0)，混合均匀后，加入等体积的酚/氯仿溶液（酚B氯仿为 4B1），冰浴 15 min，偶尔振荡。离心分相后，水相再用酚/氯仿萃取 1 次，水相与等体积的异丙醇混合，- 20 e 放置 20 min，离心后，RNA 沉淀用 70% 的乙醇洗涤，然后溶解在 DEPC 处理的水中，加入 0.33 体积的 LiCl 8 mol/L，4 e 沉淀 6 h，离心沉淀 RNA，沉淀的 RNA 用 DEPC 处理的水溶解后，再次用醋酸钠和乙醇沉淀 RNA，沉淀出的 RNA 溶解在二甲酰胺中，储存在- 80 e 的冰箱中备用。

用 AlkPhos Direct (Amresham) 非放射性系统，标记 Class II、Class ER (基因文库号: AB260983)¹⁷²、Class MT sHSP (基因文库号: AB017134)¹³² 和 Class I cDNA (由美国亚利桑拿州大学的 E. Vierling 教授提供)，标记的探针用于 Northern2blot 分析。

1.3.2 Northern2Blot 将 20 Ig RNA 经 1.2% 的甲醛琼脂糖电泳分离后转移至 Hyband2N⁺ 尼龙膜上，经紫外光固定后用非放射性 AlkPhos Direct 杂交系统 (Amresham) 进行 Northern 杂交。60 e 杂交过夜，用 60 e 的洗涤液（尿素 2 mol/L，SDS 0.1%、pH 7.0 的磷酸缓冲液 50 mmol/L，NaCl 0.15 mol/L，阻断剂 0.2 g/L）洗膜 2 次，每次 10 min，再用 Tris 缓冲液 (Tris2HCl 0.05 mol/L，pH 10，NaCl 0.1 mol/L，MgCl₂ 0.1 mol/L) 洗膜 2 次，每次 5 min，在膜表面均匀涂一层高灵敏化学发光剂 CDP2Star (Amresham)，用 X 光片进行曝光。

2 结果与分析

2.1 番茄品种花粉粒的高温败育率不同

1999 年 5 月 1 日首次测定并分析番茄花粉粒的可育性，所有品种的可育率均为 100%，电子温度记录仪显示，从播种到 5 月 1 日，栽培区最高气温为 27 e；从 5 月 1~ 14 日，最高气温为 30.1 e，5 月 14 日，第 2 次测定花粉粒的可育性，8 个品种仍未发现花粉粒的败育；5 月 14~ 28 日栽培区的最高气温上升到 32 e，5 月 28 日进行第 3 次测定，结果 8 个品种均出现了不同程度的花粉粒败育。此后数次测定结果表明，随着气温继续升高，花粉粒败育越加严重 (图 1)，品种间花粉粒败育率的差别也越来越明显。7 月 23 日进入高温季节，

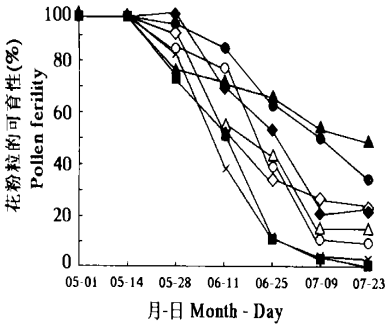


图 1 夏季高温造成的不同番茄品种花粉可育率的变化
w CLN2026E p CLN2026C s 桃太郎 r 毛粉
v 红毛茄 @Sunchery o 西粉 u UC204A
Fig 1 Pollen sterility of tomato under high temperature stress
w CLN2026E p CLN2026C s Momotaro r Maofen
v Hongmaoqie @Sunchery o Xifen u UC204A

日最高和最低气温分别达 36 e 和 25 e , 此时 CLN2026C 和 CLN2026E 的花粉粒可育率分别为 47% 和 45%, 毛粉、西粉、红毛茄和桃太朗 4 个栽培型品种的花粉粒可育率在 20% 以下, UC204A 及 Suncherry extra 花粉可育率几乎为零。因此我们认为 8 个品种中, CLN2026C

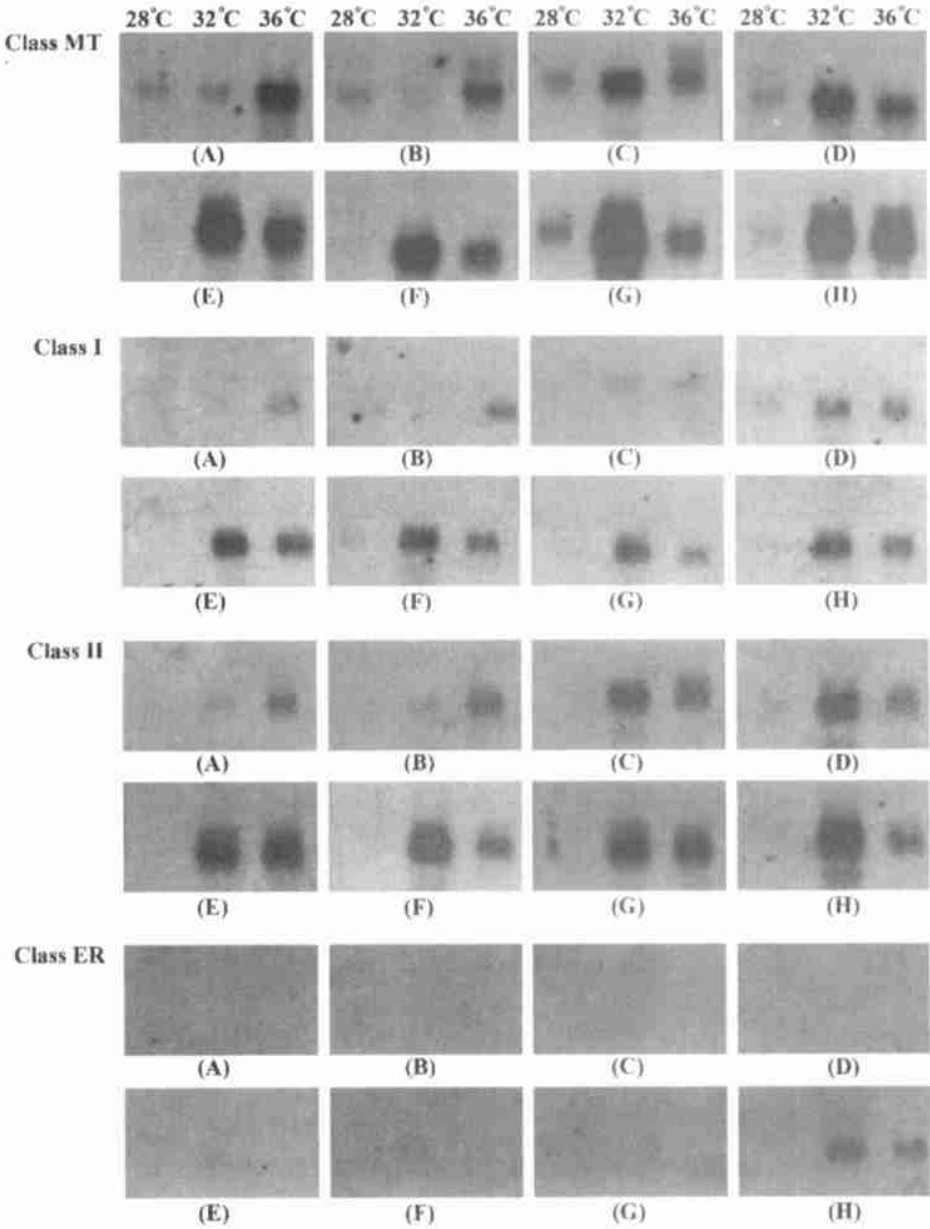


图 2 田间高温条件下 8 个番茄品种花药中 sHSP 的转录

A~ H 分别代表番茄品种 CLN2026C、CLN2026E、红毛茄、西粉、桃太朗、毛粉、UC204A 和 Suncherry。

Fig 2 The transcriptions of small HSP genes in the anthers of eight tomato varieties that were grown under the field conditions of high temperature

A) H indicates the tomato cultivars, CLN 2026C, CLN 2026E, Hongmaojie, Xifen, House momotaro, Maofen, UC204A and Suncherry, respectively.

和 CLN2026E 为耐热型, 其它均为热敏型, 而 Suncherry extra 和 UC204A 表现为极度热敏感。

2.2 耐热型与热敏型番茄花药中 sHSP 基因热激转录模式不同

7 月 23 日 6、10 和 14 时的气温分别是 28、32 和 36 e, 此时分别采集四分体时期的花药, 分析 sHSP mRNA 在花药中的累积, 结果当气温为 28 e 和 32 e 时, 耐热型番茄 CLN2026C 和 CLN2026E 的花药中 sHSP mRNA 累积相对较少, 气温从 32 e 上升到 36 e 时, sHSP mRNA 积累开始增加; 而热敏型番茄在气温从 28 e 上升到 32 e 时花药中的 sHSP mRNA 大量累积并达到高峰, 气温继续上升到 36 e 时 sHSP mRNA 的累积量反而减少。在夏季高温环境下, 白天气温的上升过程中, 热敏型花药 sHSP mRNA 表达的高峰早于耐热型花药, 或者说热敏型花药中 sHSP mRNA 表达高峰的温度低于耐热型花药。

由于 4 种 sHSP cDNA 探针长度相似, 又使用相同的 Northern 杂交方法和杂交条件, 因此 4 种 sHSP 的 Northern 信号的强弱反映了 mRNA 含量的差别, Northern 杂交信号清楚地显示, 花药中线粒体定位的 Class MT sHSP mRNA 的含量最高, 而内质网定位的 Class ER sHSP mRNA 的含量最低 (图 2)。

2.3 番茄花药中存在组成性表达的 sHSP

用 36 e 热激处理番茄植株 4 h, 然后移入 28 e 环境中使其恢复, 采集在 28 e 下恢复的番茄花药分析 sHSP mRNA 的变化, 结果发现, 停止热处理 4 h 后, sHSP mRNA 已完全消失, 说明热激后花药中 sHSP mRNA 的降解很快¹³²。利用电子温度记录仪对采样前 24 h 以及采样过程中的气温进行了监测, 发现 7 月 22 日 (采样前 1 d) 夜间 24 时的气温已降到 28 e, 此后至次日 6 时的气温低于 28 e, 即 7 月 23 日 6 时采样, 番茄植株经历了 6 h 低于 28 e 的时间间隔, 根据上述对 sHSP mRNA 降解速度的分析结果, 白天热激条件下转录的 sHSP mRNA 已经完全降解, 因此 6 时检测到的 sHSP mRNA 为 28 e 正常表达产物。

5 月 1 日和 5 月 14 日两次测定番茄花粉粒的可育率, 结果表明, 当最高气温为 30 e 时, 各品种的番茄花粉粒的败育率均为零; 5 月 14 日到 6 月 11 日, 最高环境温度上升到 32 e, 各品种番茄均出现不同程度的花粉粒轻度败育, 说明 30 e 是番茄花粉粒正常发育的最高临界温度, 而 28 e 下花药中检测到的 sHSP 是组成性表达产物。

3 讨论

3.1 花药发育过程中 sHSP 组成性表达的生物学意义

Class I⁸², Class II⁹² 和 Class MI¹³² sHSP 具有的体内和体外分子伴侣活性, 从机理上解释了为什么 sHSP 可以提高细胞的抗热性。Prandl 等¹⁰²将 HSF3 (热激转录因子 3) 导入野生型拟南芥, 发现转基因拟南芥中 HSF3 过量表达, 由此引发 HSP 在常温下大量表达。如果突然用高温胁迫拟南芥, 转基因拟南芥显示出比野生型拟南芥更强的抗热能力, 说明增加细胞内组成性热激蛋白的含量, 可以提高细胞抵抗突然热激的能力。同样, Lee 等¹¹²利用转 HSF32GUS 嵌合基因的方法也获得了类似结果。我们对常温下过量表达 Class MI sHSP 的转基因烟草进行了耐热性分析, 发现在 (CaMV) 35S 启动子驱动下, 常温下 Class MI sHSP 表达并累积在线粒体内, 使转基因烟草细胞线粒体热稳定性高于正常的线粒体, 并且转基因烟草的花粉粒的抗高温能力高于对照¹²², 说明 sHSP 对提高植物花粉粒的抗热性

具有一定的意义。本试验中, 我们除证实在发育的花药中有组成性表达的细胞质定位的 Class I 和 Class II sHSP^{15,62} 外, 还首次发现线粒体定位的 Class MI sHSP 也有较强的组成性表达, 但我们没有从发育的花药中检测到组成性表达的内质网定位的 Class ER sHSP mRNA。此外, 番茄花药中 sHSP 组成性表达强度还与品种有较大的关系。根据上述几个试验结果, 我们认为花药中组成性表达的 sHSP 增加了细胞内热激蛋白的基础含量, 可减缓因自然环境快速升温造成对高温极度敏感的花药的伤害。

3.2 花药中 sHSP 的热激应答温度较低

通过分析番茄叶片中 sHSP 的热激应答温度¹³², 我们发现常温下番茄叶片中没有组成性表达的 sHSP, 当环境温度高于 35~ 36 e 时, 叶片中 sHSP 才开始表达。但对于番茄花药而言, 在 28 e 下就有组成性表达的 sHSP, 环境温度上升到 32 e 时, 花药中 sHSP 的累积明显增加, 说明 32 e 即可引发了花药中 sHSP 的热激表达, 但小分子热激蛋白在番茄花药中的表达机理目前还不清楚。

3.3 热敏型番茄花药中 sHSP 基因转录高峰温度较低的可能起因

我们曾对生长在 28 e 下的番茄进行短期热激处理, 发现番茄花药中 sHSP 的表达高峰是 40 e¹³²。而本试验是以田间条件下的番茄为试验材料, 在白天气温上升到 36 e 时, 热敏型花药中 sHSP mRNA 的转录强度反而降低 (低于 32 e 下的转录强度), 说明进入高温季节后, 热敏型花药中 sHSP 的高温转录机制已经受到了损伤。与热敏型花药相比, 田间条件下耐热型花药 sHSP 的热激应答模式与正常花药类似, 也说明耐热型花药的损伤较小。

另外, 36 e 下热敏型花药的 sHSP 转录强度下降, 是否导致高温下的花药缺少 sHSP 的保护, 加重了热敏型花粉粒的高温败育, 也是值得进一步研究的问题。

参考文献:

- 1 Ahmadi A, Stevens A. Reproductive responses of heat tolerance tomatoes to high temperatures. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1979, 104 (5): 686~ 691
- 2 Waters E R, Lee G J, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J. Exp. Bot., 1996, 47: 325~ 338
- 3 Liu J, Shono M. Characterization of mitochondria located small heat shock protein from tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell Physiol., 1999, 40: 1297~ 1304
- 4 刘 箭, 杨晓贺, 吴显容. 菜豆下轴质膜微囊和液泡膜微囊体外热稳定性的分析. 植物学报, 1996, 38 (5): 347~ 350
- 5 Atkinson BC, Raizada M, Bouchard R A, et al. The independent stage specific expression of the 18kD heat shock protein genes during microsporogenesis in Zea mays L. Developmental Genetics, 1993, 14: 15~ 26
- 6 Kobayashi Y, Kobayashi E, Sato S, et al. Characterization of cDNAs induced in meiotic prophase in lily microsporocytes. DNA Research, 1994, 1: 15~ 26
- 7 Liu Jian, Shono M. Molecular cloning of mitochondria and endoplasmic reticulum localized small heat shock protein from tomato. Acta Botanica Sinica, 2001, 2: 138~ 145
- 8 Lee G J, Pokala N, Vierling E. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock protein from pea. J. Biol. Chem., 1995, 270: 10432~ 10438
- 9 Collade C, Gomez R, Casado R, et al. Purification and in vitro chaperone activity of a class I small heat shock protein abundant in recalcitrant chestnut seeds. Plant Physiol., 1997, 115: 71~ 77
- 10 Prindl R, Hinderhofer G, Egger-Schumacher, et al. HSF3, a new heat shock factor from Arabidopsis thaliana derepresses the

heat shock responses thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 259: 269~ 278

- 11 Lee J H, Hubel A, Schoffl F. Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock protein and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 1995, 8: 603~ 612
- 12 Liu J, Sanmiya K, Suzuki K. Analysis of mitochondrial small heat shock protein function in transgenic tobacco. *Plant and cell physiology*, 2000, (40): 41

Transcription of the Small Heat Shock Protein Genes in Tomato Anthers

Liu Jian¹ and Mariko Shono²

(¹Department of Biology, Shandong Normal University, Jinan 250000; ²Japan International Research Center for Agricultural Science, Ishigaki, Okinawa, Japan 907)

Abstract: Eight tomato cultivars with different heat tolerance were planted in the subtropical area. The ratios of pollen sterile were checked in the summer. According to pollen sterility, the tomato plants were classified into two types: heat tolerant type and heat sensitive type. Meanwhile, the transcription of four types of small heat shock protein genes in tomato anthers were analyzed. The constitutive mRNA of cytosolic and mitochondria located small heat shock protein genes were detected in the anthers. The significant heat induced transcription of cytosolic and mitochondria located sHSP genes occurred in the summer. The temperature corresponding to the sHSP transcription peak in anthers of heat sensitive cultivars was lower than that of the heat tolerance cultivars.

Key words: Small heat shock protein; Pollen; Sterility; High temperature stress; Tomato; Anther

欢迎订阅 2002 年下列期刊

5 中国生态农业学报 是由中国科学院石家庄农业现代化研究所和中国生态经济学会主办的学术期刊。季刊, 大 16 开本, 每期定价 6.5 元, 全年 26.00 元。邮发代号: 182158, 全国各地邮局均可订阅, 漏订者可直接汇款至编辑部补订 (全年需另加邮资 6.00 元)。地址: (050021) 河北省石家庄市槐中路 286 号中国科学院 5 中国生态农业学报 编辑部, 电话: (0311) 5818007。

5 中国生物防治 是由农业部主管, 中国农科院生物防治研究所主办的全国性学术期刊。季刊, 季中月 8 日出版, 16 开本, 48 页, 另外出版一期增刊。国内邮发代号: 22507, 国外代号: Q812。每册定价 5 元, 全年 (包括增刊) 25 元。编辑部地址: 北京中关村南大街 12 号, 邮政编码: 100081, 电话: 68919587。

5 北方瓜菜报#果农信息专刊 由北方瓜菜报社主办, 随北方瓜菜报发行。四开八版, 旬刊, 全年报价 36 元, 邮发代号: 15) 28。凡 2002 年的订户均免费刊登一次百字以内的小广告。本专刊自办发行, 订阅者请将款汇至: 江苏省丰县中阳大道 5 北方瓜菜报#果农信息专刊 编辑部马新存收。邮编: 221700。在全国各地邮局订阅北方瓜菜报, 均包含果农信息专刊 36 期, 不需另汇款单独订阅。电话: 05164208995。