

苹果花粉中与花柱 S-RNase 互作的 γ -硫堇筛选及鉴定

孙会玲, 孟冬, 白松龄, 胡建芳, 李天忠*

(中国农业大学农学与生物技术学院果树细胞与分子育种实验室, 北京 100193)

摘要: 以‘国光’苹果 (S_1S_2) 花粉为材料, 成功构建了酵母 pGADT7-cDNA 文库, 转化效率约为 $1.2 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$, 插入片段大小在 300 ~ 2 000 bp 之间。通过酵母双杂交方法, 用苹果 S_2 -RNase 的 C2HVC3 区筛选文库获得一个长 505 bp 的 cDNA 片段, 经分析发现该 cDNA 序列上有一个 261 bp 的开放阅读框 (ORF), 该 ORF 编码一个具 N 端信号肽的多肽, 该成熟多肽由 64 个氨基酸组成, 富含带正电荷的赖氨酸和精氨酸, 其 C 端有 8 个半胱氨酸和一个 γ -硫堇功能域, 结构预测显示其具有一个 α 螺旋, 3 个 β 折叠, 4 个二硫键, 由此, 推断其为苹果 γ -硫堇, 命名为 MdD1。RT-PCR 分析发现: *MdD1* 基因在‘国光’苹果叶片、萼片、花瓣、子房、花药和花柱等组织中都有表达, 但花药中表达量最高。酵母双杂交结果表明 MdD1 除了与苹果 S_2 -RNase 的 C2HVC3 区互作外, 还与 S_1 -RNase 的 C2HVC3 区, S_1 、 S_2 -RNase 的成熟多肽区存在互作。初步认为: 苹果 γ -硫堇可能通过与 S-RNase 非特异性互作, 作为花粉非 S 因子参与自交不亲和反应。

关键词: 苹果; S-RNase; 自交不亲和; 花粉 cDNA 文库; 酵母双杂交; γ -硫堇

中图分类号: S 661.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 08-1437-10

Screen and Identification of Pollen γ -thionin Interacting with Style S-RNase in Apple

SUN Hui-ling, MENG Dong, BAI Song-ling, HU Jian-fang, and LI Tian-zhong*

(Laboratory of Fruit Cell and Molecular Breeding, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Yeast pGADT7-cDNA library was successfully constructed for apple ‘Ralls Janet’ pollen, with a transformation efficiency up to $1.2 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ and being inserted by sequences of 300 - 2 000 bp in size. Through yeast two-hybrid (Y2H) assay, one cDNA of 505 bp in size was screened from the library by C2HVC3 domain of apple S_2 -RNase as bait. The cDNA was predicted to contain one complete ORF of 216 bp in size, coding an peptide with a signal peptide on its N terminal. The deduced mature peptide was designated apple γ -thionin MdD1 for that it contained both 8 cysteines and γ -thionin motif on its C terminal, was rich in Lys and Arg with positive charge. Structure prediction revealed one α -helix, three β -sheets and four disulfide bones. RT-PCR showed that the gene *MdD1* preferentially expressed in anther,

收稿日期: 2011 - 04 - 22; 修回日期: 2011 - 07 - 07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871697, 31071784); 北京市自然科学基金项目 (6102017)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: litianzhong1535@163.com)

though also expressed in other tissues such as leaf, sepal, petal, ovary and style of apple ‘Ralls Janet’. Y2H assay showed that MdD1 interacted with S-RNase nonspecifically, because it not only interacted with apple S₂-RNase-C2HVC3, but also with S₁-RNase-C2HVC3, mature peptide of S₁-RNase and S₂-RNase. All these results taken together suggest that apple γ -thionin MdD1 may be involved in SI as a pollen non-S factor interacting with S-RNase nonspecifically.

Key words: apple; S-RNase; self-incompatibility; pollen cDNA library; yeast two-hybrid; γ -thionin

自交不亲和是被子植物中一种促进异交,防止自交的繁育策略。包括苹果在内的蔷薇科果树属于配子体自交不亲和类型(GSI)。目前研究认为,该自交不亲和类型由单一位点S位点控制(de Nettancourt, 1997),包括花柱S决定子和花粉S决定子基因。花柱S决定子编码具有核酸酶活性的糖蛋白S-RNase(Anderson et al., 1986; McClure et al., 1990; Lee et al., 1994; Murfett et al., 1994),花粉S决定子编码N端含有保守F-box结构域的SFB/SLF(Lai et al., 2002; Ushijima et al., 2003; Sijacic et al., 2004)。自交不亲和(SI)反应主要由这两种决定子蛋白间的相互作用决定。在矮牵牛中的最新研究表明,每种S基因型中都具有多个花粉决定子SLF,其编码的蛋白协同作用共同识别花柱中的S-RNase,由此控制自交不亲和反应的发生(Kubo et al., 2010)。但通过经典遗传学和分子遗传学的研究发现,自交不亲和现象远比想象的要复杂得多,并非花粉和花柱S决定子间的简单识别作用。Beecher和McClure(2001)通过烟草转基因发现,将S_{A2}-RNase基因转入烟草*Nicotiana tabacum*(SC)后并不能改变其亲和性,即通过转化单一的S-RNase基因,不一定能够使自交亲和品种恢复拒斥自花花粉的能力(McClure et al., 2000)。这说明自交不亲和反应是一种花粉和花柱细胞间复杂的信号转导过程,除花柱和花粉S决定子外,应当还有很多其他的非S因子(non-S-RNase/SLF factors)参与其中。

目前的研究大部分还集中于S决定子上,对非S因子的研究较少。已经发现的可能参与自交不亲和反应的非S因子主要有:在茄科和烟草中发现的一种花柱特异表达的蛋白HT-B(McClure et al., 1999; Goldraij et al., 2006; Alejandro et al., 2009; Puerta et al., 2009),可能作为E3泛素连接酶参与泛素化降解S-RNase的SBP(S-RNase binding protein)(Sims & Ordanic, 2001; Hua & Kao, 2008),参与形成SCF复合体的蛋白SSK1(S-Locus F-Box interacting-skp1 like 1)(Huang et al., 2006; Zhao et al., 2010)和Cullin1(Li & Chetelat, 2010)等。这些非S因子在花粉和花柱相互识别过程中,可能起到识别和降解S-RNase,细胞信号转导,调节花粉管生长等作用,最终由于S决定子与非S因子的共同作用而产生自交不亲和现象。因此,为阐明自交不亲和现象的本质,应当找到那些可能参与自交不亲和反应的非S因子。

为寻找苹果花粉中与花柱决定子S-RNase互作且可能参与自交不亲和的未知非S因子,本研究中以苹果花柱S₂-RNase的C2HVC3区作为诱饵,采用酵母双杂交的方法筛选‘国光’苹果花粉pGADT7-cDNA酵母文库,获得了一个小分子的带正电荷的 γ -硫堇MdD1。通过MdD1基因组织特性表达分析及多肽与S-RNase酵母双杂交互作分析,初步认为其可能为苹果SI反应中的非S因子。

1 材料与方法

1.1 材料

于2009年和2010年的5月在辽宁省果树科学研究所资源保存圃采集‘国光’苹果(S₁S₂)蕾期的花药、花柱、叶片、萼片、花瓣、子房。花药阴干后, -20℃保存备用,其余材料采集后立即

冷冻, -80°C 保存备用。

1.2 花粉酵母 cDNA 文库的构建

采用改良的 CTAB 法 (Chang et al., 1993) 提取 ‘国光’ 花粉总 RNA, 用 DNase I 去除 DNA, 无水乙醇纯化。采用微量紫外分光光度计检测 OD_{260} 、 OD_{280} 的值, 计算总 RNA 浓度。以花粉 RNA 为模板, 使用 BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits (Clontech) 中包含的 RT-PCR 试剂, 合成 dsDNA。用 BD CHROMA SPIN™ TE-400 Column 纯化 dsDNA, 方法同 BD CHROMA SPIN™ Purification 手册 (No. PT1300-1)。将 dsDNA、pGADT7-Rec、Herring Testes Carrier DNA 共转化到酵母菌 AH109 感受态细胞中, SD/-Leu 上培养 3~6 d, 随机挑取平板上的克隆, 用 pGADT7-Rec 上的通用引物 AD-LD (上游 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACC-3', 下游 5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT-3') 鉴定重组到 pGADT7-Rec 载体上外源 cDNA 片段大小。收集全部菌体到一定液体 SD/-Leu 中, 每份分装成 1 mL, -80°C 保存备用。将酵母文库菌液按 1/100、1/1 000、1/10 000 稀释并涂布在 SD/-Leu 上, 计算库容量。

1.3 花柱 S-RNase 诱饵载体构建

根据苹果花柱 S_1 -RNase (登录号: D50837) 和 S_2 -RNase (登录号: U12199) 序列, 设计、合成引物, 上、下游引物两端分别插入酶切位点 *EcoR* I 和 *Pst* I (见下划线) 和保护碱基。以花粉 cDNA 为模板, 扩增 C2HVC3 区, 分别用 S_1 -和 S_2 -RNase 的引物 (上游 5'-GGAATTC^{CCCA}ACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAG-3'; 下游 5'-AAA^{ACT}GCAGACAAGAGCCATGTTTATCCCACTGTTTACG-3'; 上游 5'-CAGGAATTC^{CCT}ACTCCTTGTAAGATCCTCCTGAC-3', 下游 5'-TATAAA^{ACT}GCAGACAGGCGCCGTGTTTGTTC-3')。同时, 扩增成熟多肽区 (mat), 分别用 S_1 -、 S_2 -RNase 的引物 (上游 5'-GCGGAATTC^{CTT}CGATTATTATCAATTTACGCAGCA-3', 下游 5'-AAA^{ACT}GCAGATACTGATATTGGTGGGGCAGAAA-3'; 上游 5'-CCGGAATTC^{TCT}ACGATTATTTTCAATTTACGCA-3', 下游 5'-CGGG^{CT}GCAGATACAGAATATGATTGGTG-3')。PCR 产物电泳、回收、连接到 pMD18-T 载体, 转化涂板, 挑斑做 PCR, 阳性菌落送去测序。测序正确的质粒, 进行酶切, 用 *T4* 连接酶将目的片段连接至酵母表达载体 pGBKT7。诱饵质粒 pGBKT7: S_1 -mat、pGBKT7: S_2 -mat, 用于之后的互作鉴定, 质粒 pGBKT7: S_1 -C2HVC3、pGBKT7: S_2 -C2HVC3 用以筛选文库。将测序正确的诱饵质粒 pGBKT7: S_1 -C2HVC3、pGBKT7: S_2 -C2HVC3、空载 pGBKT7 用 LiAc/ss-DNA/PEG 法 (Gietz & Woods, 2002) 分别转化到酵母 Y187 中, 涂在 SD/-Trp 平板, 30°C 培养 3~4 d, 长出的克隆用于下一步的筛选文库。

另外, 将长出的克隆分别涂布到二缺 (SD/-Trp-Leu)、三缺 (SD/-Trp-Leu-His)、四缺 (SD/-Trp-Leu-His-Ade) 酵母培养基上, 检测是否存在自激活效应和自毒性。

1.4 花粉酵母 cDNA 文库筛选与互作子的再鉴定

将 pGBKT7: S_1 -C2HVC3、pGBKT7: S_2 -C2HVC3 诱饵质粒的菌 Y187 与含花粉 cDNA 文库的菌 AH109 进行交配, 详细方法参考 Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits (PT3955-1, Clontech) 说明书。 30°C 、 $30\sim 50\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 轻摇 20~24 h, SD/-Trp-Leu-His-Ade 皿筛选培养上。6 d 后, 挑选白色的直径大于 2 mm 的菌落加 $1\sim 2\text{ }\mu\text{L}$ X- α -gal ($4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 显色分析。初步确定显蓝色快 (3 h 以内) 和蓝色深的菌落为阳性克隆, 将之于液体 SD/-Trp-Leu-His-Ade 震荡培养, 提取质粒, 并用 pGADT7-Rec 上的通用引物鉴定捕获的 AD 质粒上重组的 cDNA 片段大小。

筛选文库获得的质粒经 *E. coli* DH5 α 扩繁后, 提出质粒, 将之与诱饵质粒用 LiAc/ss-DNA/PEG

法 (Agatep et al., 1998) 共转化酵母 AH109 以再次确认互作, pGBKT7-53 和 pGADT7-SV40 为阳性对照, pGBKT7 和 pGADT7 为阴性对照, 进行 X- α -gal 或 β -gal 显色。

1.5 基因的测序和分析

将诱饵质粒 pGBKT7: S₁-C2HVC3、pGBKT7: S₂-C2HVC3 捕获的 AD 质粒测序。用 DNAMAN 分析 AD 上的 cDNA 序列, 并用 NCBI 的 ORF Finder 在线寻找其上的 ORF 再采用 NCBI 上的 Blast 在线工具寻找其同源基因, 进而与苹果基因进行比对 (<http://genomics.research.iasma.it/#>), 检测基因序列的完整性。最后对获得的蛋白进行在线分析: 预测蛋白质的理化性质 (ProtParam tool)、功能域 (CD-Search)、信号肽 (SignalP) 和高级结构预测 (ESPrpt 2.2) 等。

1.6 基因的组织特异性分析

提取‘国光’苹果小花药 (花蕾最大宽度的平均值约 0.5 cm)、中花药 (花蕾最大宽度的平均值约 1 cm)、花柱、叶片、萼片、花瓣、子房总 RNA (方法同 1.2), 反转录成 cDNA, 具体方法参照 MMLV 反转录酶说明书, 用于组织特异性分析。

用引物 (上游 5'-CAGACAAGGTAGCTAAGGAAAGGACATG-3', 下游 5'-TACGACGAAAGCCCTGGCATTG-3') 进行 PCR 扩增, 以检测 *MdDI* 在各个组织中的表达情况, β -Actin 作为苹果内参。

2 结果与分析

2.1 ‘国光’苹果花粉酵母 cDNA 文库的构建

花粉总 RNA 电泳显示, 28S:18S 两条带的亮度接近 2:1 (图 1, A), 浓度为 $0.74 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 符合建库要求。

将花粉总 RNA 反转录后, 以单链 cDNA 为模板进行 LD-PCR 扩增 cDNA 文库。合成的双链 cDNA 大小在 0.5~4.0 kb 之间 (图 1, B)。

纯化的 dscDNA 与 pGADT7-Rec 共转化酵母 AH109。花粉 cDNA 文库的库容量约为 $1.2 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ (图 1, C)。

随机挑取平板上的单克隆, 提取质粒后进行 PCR, 可见插入片段在 300~2 000 bp 之间 (图 1, D)。

以上结果表明 cDNA 文库构建成功。

2.2 苹果花柱 S-RNase 酵母双杂交诱饵载体构建

以‘国光’苹果花柱 cDNA 为模板, 分别扩增 S₁-RNase、S₂-RNase 的 C2HVC3 区和 mat 区, 目标片段 S₁-C2HVC3 为 206 bp, S₁-mat 为 618 bp, S₂-C2HVC3 为 217 bp, S₂-mat 为 621 bp, 连接至 pMD18-T 载体后测序, 获得正确的克隆。

质粒扩繁后, 经酶切连接到酵母表达载体 pGBKT7 上。酶切和测序结果表明: 载体构建正确 (图 2)。

将诱饵质粒 pGBKT7: S₁-C2HVC3、pGBKT7: S₂-C2HVC3 和空载质粒 pGBKT7 分别成功转化到酵母 Y187 后, 发现转化菌只在 SD/-Trp 上生长, 不在二缺 (SD/-Trp-Leu)、三缺 (SD/-Trp-Leu-His)、四缺 (SD/-Trp-Leu-Ade-His) 培养基上生长, 说明无自激活效应。含诱饵质粒和空载质粒的酵母的转化效率相近, 且转化菌用 YPDA 培养一定时间后菌液的 OD₆₀₀ 值正常, 说明诱饵质粒表达的蛋白对酵母 Y187 无毒性。

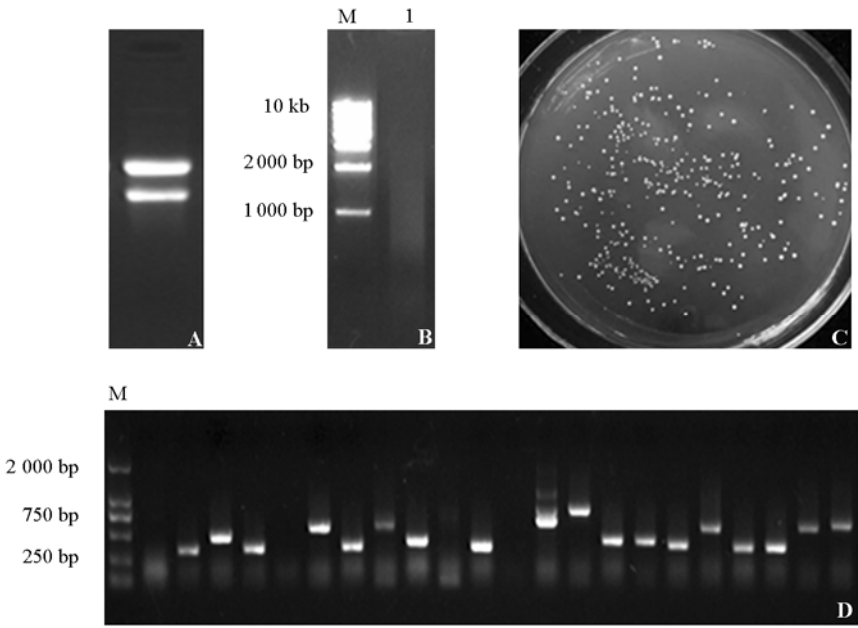


图 1 ‘国光’ 苹果花粉 cDNA 酵母文库的构建

A: 花粉总 RNA; B: LD-PCR 合成的双链 cDNA (M 为 1 kb ladder; 1 为双链 cDNA); C: 酵母文库的容量检测 (通过 pGADT7-cDNA 的酵母菌稀释 10 000 所长出的克隆); D: 花粉文库质量鉴定图 (M 为 DL2000 marker)。

Fig. 1 Construction of yeast pollen cDNA library for apple ‘Ralls Janet’

A: Total RNA of pollen; B: Double strand cDNA amplified by LD-PCR (M for 1 kb ladder; 1 for double strand cDNA);
C: Estimation of the capacity of constructed library by yeast clones contained pGADT7-cDNA in 10 000 dilutions;
D: The qualification test for the library (M for DL2000 marker) .

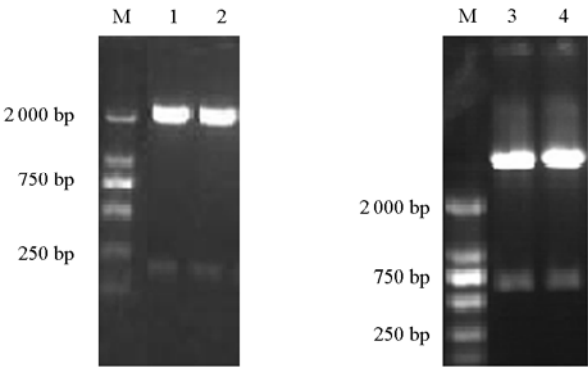


图 2 苹果花柱 S-RNase 酵母双杂交载体构建

M: DL2000 marker. 1 ~ 4 分别为 pMD18-T: S₁-C2HVC3, pMD18-T: S₂-C2HVC3, pGBKT7: S₁-mat 和 pGBKT7: S₂-mat 的双酶切图。

Fig. 2 Plasmids construction of apple style S-RNase for Y2H assay

M: DL2000 marker. 1 - 4 for the double digest products of pMD18-T: S₁-C2HVC3, pMD18-T: S₂-C2HVC3, pGBKT7: S₁-mat and pGBKT7: S₂-mat, respectively.

2.3 与 S₂-RNase-C2HVC3 互作的 B42 的获得

以 pGBKT7: S₁-C2HVC3 和 pGBKT7: S₂-C2HVC3 为诱饵, 筛选花粉酵母 cDNA 文库。将所得阳性克隆分离出 pGADT7 (AD) 质粒, 用 AD-LD 引物进行 PCR, 鉴定插入的 cDNA 的大小。其中, pGBKT7: S₂-C2HVC3 筛选获得一编号为 B42, PCR 产物约 538 bp 的 AD 质粒 (图 3, A 箭头

所示)。将之从酵母菌中分离,经 *E. coli* DH5 α 扩繁,与诱饵质粒 pGBKT7: S₂-C2HVC3 共转酵母 AH109,涂于 SD/-Trp-Leu 上,第 3 天发现长出白色克隆。再挑斑涂布于 SD/-Trp-Leu-His-Ade,亦能生长,且 β -gal 分析显蓝色(图 3, B),确认互作存在。

测序后,将该序列与苹果基因组比对,发现它存在于‘金冠’苹果基因组第 13 号染色体 MDC 001747.422 上。ORF Finder 预测到一开放阅读框,暂定名为: B42-ORF。经 BLASTp 发现它与日本梨 (*Pyrus pyrifolia*) 防御蛋白家族成员之一 (BAB64929.1) 相似性达到 78% ($E = 1e-31$),推断与 S₂-RNase- C2HVC3 互作的蛋白可能为防御蛋白。

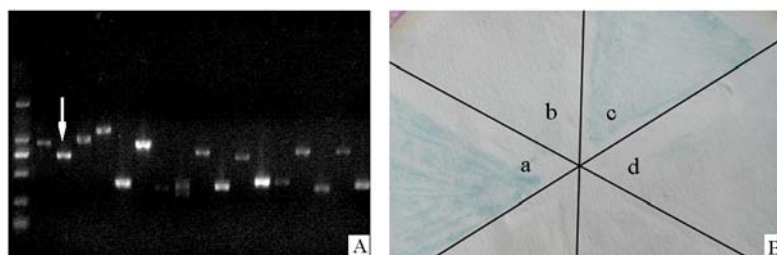


图 3 苹果花粉 pGADT7-cDNA 酵母文库筛选 (A) 与阳性克隆 B42 的鉴定 (B)

A: 捕获质粒中插入的 cDNA 大小,箭头所示为质粒 AD-B42 的 PCR 带; B: 双质粒共转 AH109 后进行 β -gal 染色结果 (a 为阳性对照; b 为阴性对照; c 为 AH109 含 pGADT7: B42 与 pGBKT7: S₂-C2HVC3; d 为 AH109 含 pGADT7: B42 与 pGBKT7)。

Fig. 3 Screen of apple pollen pGADT7-cDNA library and identification of the positive clones B42

A: The PCR products of cDNA inserts of prey plasmid. The arrow indicated the PCR product of plasmid B42;

B: The β -gal assay of AH109 co-transformed with double plasmids (a for positive control;

b for negative control; c for AH109 co-transformed with pGADT7: B42 and pGBKT7: S₂-C2HVC3;

d for AH109 co-transformed with pGADT7: B42 and pGBKT7) .

2.4 防御蛋白候选 B42 基因结构预测与分析

S₂-RNase: C2HVC3 捕获得到的 B42-ORF 利用 SignalP 分析发现其 N 端有一包含 23 个氨基酸的信号肽(图 4)。经 ProtParam 在线预测其成熟多肽为: 有 64 个氨基酸,分子量为 7 018.1 D, PI 为 9.57, 具有较多的阳性氨基酸 (Arg + Lys = 15 个), 性质稳定, 且具有 8 个半胱氨酸(分布在成熟多肽的第 20、31、37、41、51、58、60、64 位)。

功能域分析发现: 其含有 γ -硫堇(或称硫素, gamma-thionin, IPR008176, $E = 4.77e-09$)。前面序列比对发现该多肽与日本梨上的防御蛋白相似, Pelegriani 等(2008)认为 γ -硫堇(gamma-thionin)即为植物防御蛋白(plant defensin)。与花中特异性表达的烟草防御蛋白 NaD1 (PDB ID: 1MR4) 和矮牵牛 PhD1 (PDB ID: 1N4N) 进行氨基酸序列比对结果显示: 三者 C 端的 8 个半胱氨酸保守。



图 4 MdD1 的氨基酸序列

Fig. 4 Amino acid sequence of MdD1

结构预测 (图 5) 显示: 该蛋白含有 1 个 α 螺旋、3 个 β 折叠、4 个二硫键 (disulfide bond)。由此推断: B42 具有 γ -硫基的典型特征, 故认定 B42 为苹果 γ -硫基, 命名为 MdD1。

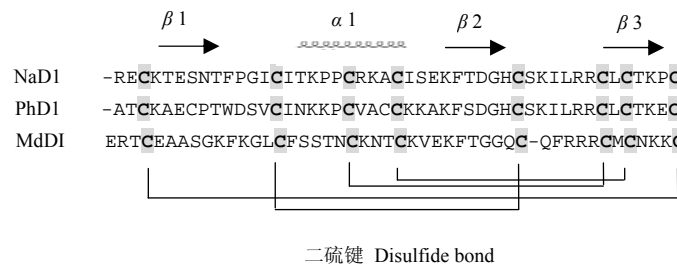


图 5 MdD1 与 NaD1、PhD1 部分多肽序列比对及 MdD1 的二级结构预测

Fig. 5 Partial peptide sequences alignment of MdD1, NaD1 and PhD1 and possible secondary structure of MdD1

2.5 酵母双杂交验证 MdD1 与苹果花柱 S-RNase 的互作关系

为了证明 MdD1 是否与苹果花柱 S₂-RNase 成熟多肽区、S₁-RNase 存在互作, 以 pGBKT7: S₂-mat、pGBKT7: S₁-C2HVC3、pGBKT7: S₁-mat 为诱饵质粒, 分别与 ‘国光’ 苹果花粉酵母文库中分离得到的质粒 pGADT7: B42 分别共转染至酵母 AH109 中, 涂布在二缺 (SD/-Trp-Leu) 培养基上, 30 °C 培养, 第 3 天发现都长出了白色的菌落, 说明质粒均被成功转化进去。

第 4 天挑选菌斑划线接种到三缺 (SD/-Trp-Leu-His) 和四缺 (SD/-Trp-Leu-His-Ade) 培养基上。结果显示: 为阴性对照的酵母 (图 6, 1 ~ 6) 不能在四缺培养基上生长, 逐渐变红及至死亡; 而阳性对照的酵母和共转了 MdD1 与 S-RNase 的 C2HVC3 和成熟多肽的酵母都能在四缺培养基上生长, 菌斑呈白色 (图 6, 7 ~ 11), 且经 X- α -gal 显色后, 呈蓝色。结果表明, AD-B42 质粒也与 pGBKT7: S₂-mat、pGBKT7-S₁-C2HVC3、pGBKT7: S₁-mat 质粒存在互作, 证明 MdD1 与 S-RNase 的互作无单元型特异性。

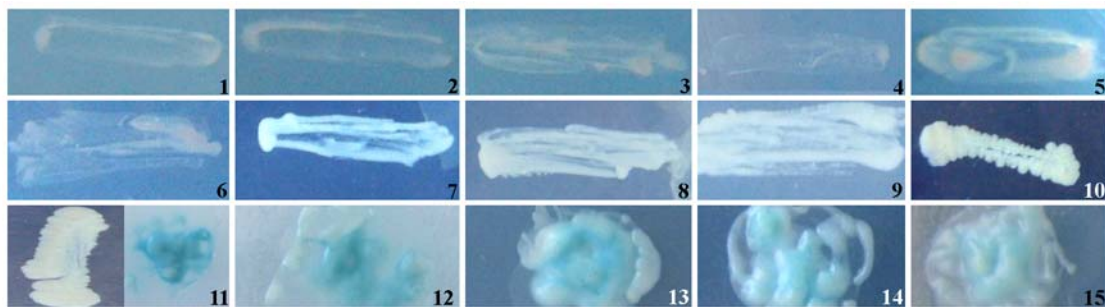


图 6 MdD1 与苹果花柱 S-RNase 的酵母互作

1. pGBKT7 + pGADT7; 2. pGBKT7: S₁-C2HVC3 + pGADT7; 3. pGBKT7: S₁-mat + pGADT7; 4. pGBKT7: S₂-C2HVC3 + pGADT7; 5. pGBKT7: S₂-mat + pGADT7; 6. pGBKT7 + pGADT7: B42; 7. pGBKT7: S₁-C2HVC3 + pGADT7: B42; 8. pGBKT7: S₁-mat + pGADT7: B42; 9. pGBKT7: S₂-C2HVC3 + pGADT7: B42; 10. pGBKT7: S₂-mat + pGADT7: B42; 11. 阳性对照 (左为正常的在 SD/-Trp-Leu-Ade-His 培养基上生长的菌, 右为显色后呈蓝色的菌); 12 ~ 15: 图 7 ~ 10 酵母菌的 X- α -gal 显色。

Fig. 6 The interaction between MdD1 and S-RNase in yeast

1. pGBKT7 + pGADT7; 2. pGBKT7: S₁-C2HVC3 + pGADT7; 3. pGBKT7: S₁-mat + pGADT7; 4. pGBKT7: S₂-C2HVC3 + pGADT7; 5. pGBKT7: S₂-mat + pGADT7; 6. pGBKT7 + pGADT7: B42; 7. pGBKT7: S₁-C2HVC3 + pGADT7: B42; 8. pGBKT7: S₁-mat + pGADT7: B42; 9. pGBKT7: S₂-C2HVC3 + pGADT7: B42; 10. pGBKT7: S₂-mat + pGADT7: B42; 11. Positive control (Left: Normal yeast on SD/-Trp-Leu-Ade-His; Right: Blue yeast after X- α -gal assay); 12 ~ 15. X- α -gal assay for picture 7 ~ 10.

2.6 *MdD1* 的苹果组织特异性表达分析

以‘国光’苹果叶片、萼片、花瓣、子房、小花药、中花药、花柱的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *MdD1* 基因, 结果显示: 它在各个组织中都有表达 (图 7), 但在花药中表达量最高。这表明该基因可能为组成型表达。

研究发现, 在成熟的花粉粒中, 储备了大量的 mRNA, 花粉的萌发初期才会被大量翻译, 参与花粉管萌发和伸长 (Mascarenhas, 1988)。这暗示了 *MdD1* 与花粉的成熟、萌发可能具有密切地联系。

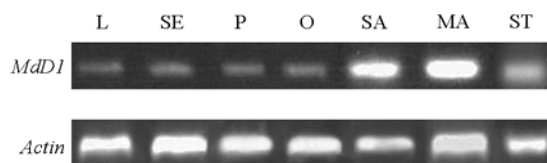


图 7 *MdD1* 在‘国光’各个组织中的特异性表达分析

L: 叶片; SE: 萼片; P: 花瓣; O: 子房; SA: 小花药; MA: 中花药; ST: 花柱。

Fig. 7 Expression pattern in several tissues of the *MdD1*

L: Leaf; SE: Sepal; P: Petal; O: Ovary; SA: Small anther; MA: Middle anther; ST: Style.

3 讨论

本研究中利用花柱 S_2 -RNase 上包含可能参与特异性识别的 HV 区和核酸酶活性必需的 C2、C3 区——即 C2HVC3 区为诱饵, 筛选‘国光’苹果 (S_1S_2) 花粉 cDNA 文库, 获得小分子的带正电荷的 γ -硫堇 MdD1。根据其序列和高级结构特征推断它属于 AMPs 家族下的硫堇亚家族。这是在苹果花上首次得到的硫堇基因。苹果上得到的第一个硫堇是在种子里分离得到, 且与苹果的抗火疫病相关 (Romeiro et al., 1981; Goodman, 1983)。目前, γ -硫堇在烟草 (Gu et al., 1992)、矮牵牛 (Karunanandaa et al., 1994)、甜高粱 (Bloch & Richardson, 1991)、豇豆 (Melo et al., 2002) 等都有报道, 多分布在胚乳、茎、根、黄化或染病的叶片及花中。植物上的大多数硫堇具有抗菌活性, 此外, 有些硫堇还能抑制昆虫的淀粉酶或某些蛋白酶的活性而参与植物防御 (Melo et al., 2002; Pelegriani & Franco, 2005; Pelegriani et al., 2008)。

本研究所得的多肽 MdD1, 含 64 个氨基酸, 分子量为 7 018.1 D, 比以往获得的含 45~47 个氨基酸、分子量为 5 000 D 的硫堇 (Florack & Stiekema, 1994) 略微大。另外, 有人认为 γ -硫堇 (gamma-thionin) 即是植物防御素, 为 45~54 个氨基酸 (Pelegriani et al., 2008)。由此, 多肽 MdD1、防御素、 γ -硫堇三者相似的结构暗示了共同的起源及相似的功能, 但分子量和序列的差异又预示着多肽 MdD1 的功能与它们又不完全相同。

该多肽尽管在各个组织中都有表达, 但在花药中表达量尤其高。则说明它可能与花粉的成熟、萌发, 花粉管的伸长或花粉花柱互作具有密切联系。尽管有富含半胱氨酸的多肽作为细胞信号分子参与自交不亲和中特异性识别的报道 (Suzuki et al., 1999; Takayama et al., 2000; Wheeler et al., 2009), 但由于酵母系统中 MdD1 与 S-RNase 二者互作的非特异性, 故排除二者的互作介导花粉花柱的特异性识别, 且推断 MdD1 可能是作为非 S 因子参与自交不亲和。

S-RNase 的活性是拒斥花粉反应所必需的 (Huang et al., 1994)。有文献指出: 花粉中可能存在核酸酶抑制子 (RI) 能对 S-RNase 的活性产生抑制 (Golz et al., 2001; Luu et al., 2001)。推测 MdD1

可能像某些硫基一样, 具备蛋白酶抑制剂活性而抑制 S-RNase 的活性。由于参与特异性识别的高变区处在活性区(或说 RI 结合区)C2 和 C3 区中间, 而负责特异性识别的花粉因子能识别自我 S-RNase, 从而阻碍 MdD1 对自我 S-RNase 活性的抑制, 进而自我 S-RNase 能发挥细胞毒性作用, 降解花粉管 RNA (McClure et al., 1990)。这与抑制剂模型 (Luu et al., 2001) 理论一致。以上假设需要通过检测 MdD1 与 S-RNase 的互作是否发生在花粉管及互作后 S-RNase 的活性是否下降等验证。

综上所述: MdD1 可能是作为非 S 因子参与自交不亲和, 对于是否充当核酸酶抑制子还有待于进一步的研究。

References

- Agatep R, Kirkpatrick R D, Parchaliuk D L, Woods R A, Gietz R D. 1998. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online (<http://tto.trends.com>) .
- Alejandro R P, Ushijima K, Koba T, Sassa H. 2009. Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *Journal of Experimental Botany*, 60 (4): 1309 – 1318.
- Anderson M A, Cornish E C, Mau S L, Williams E G, Hoggart R, Atkinson A, Bonig I, Grego B, Simpson R, Roche P, Haley J D, Penschow J, Niall H D, Tregear G W, Coghlan J P, Crawford R J, Clarke A E. 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 321: 38 – 44.
- Beecher B, McClure B A. 2001. Effects of RNases on rejection of pollen from *Nicotiana tabacum* and *N. plumbaginifolia*. *Sex Plant Reprod*, 14: 69 – 76.
- Bloch C J, Richardson M. 1991. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. *FEBS Letter*, 279 (1): 101 – 104.
- Chang S J, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11: 113 – 116.
- de Nettancourt. 1997. Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reprod*, 10: 185 – 199.
- Florack D E A, Stiekema W J. 1994. Thionines: Properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Molecular Biology*, 26: 25 – 37.
- Gietz R D, Woods R A. 2002. A transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350: 87 – 96.
- Goldraij A, Kondo K, Lee C B, Hancock C N, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips T E, Cruz-Garcia F, McClure B. 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, 439: 805 – 810.
- Golz J F, Oh H Y, Su V, Kusaba M, Newbigin E. 2001. Genetic analysis of *Nicotiana* pollen-part mutants is consistent with the presence of an S-ribonuclease inhibitor at the S locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (26): 15372 – 15376.
- Goodman R N. 1983. Occurrence and possible role of thionin-like proteins in apple, tomato, melon and rice seed. *European Journal of Plant Pathology*, 89 (6): 306 – 307.
- Gu Q, Kawata E E, Morse M J, Wu H M, Cheung A Y. 1992. A flower-specific cDNA encoding a novel thionin in tobacco. *Molecular and General Genetics*, 234: 89 – 96.
- Hua Z, Kao T H. 2008. Identification of major lysine residues of S3-RNase of *Petunia inflata* involved in ubiquitin – 26S proteasome-mediated degradation *in vitro*. *The Plant Journal*, 54 (6): 1094 – 1104.
- Huang J, Zhao L, Yang Q, Xue Y. 2006. AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *Plant Journal*, 46: 780 – 793.
- Huang S, Lee H S, Karunanandaa B, Kao T. 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell*, 6 (7): 1021 – 1028.
- Karunanandaa B, Singh A, Kao T H. 1994. Characterization of a predominantly pistil-expressed gene encoding a γ -thionin-like protein of *Petunia inflata*. *Plant Molecular Biology*, (26): 459 – 464.

- Kubo K, Entani T, Takara A. 2010. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science*, 330 (6005): 796 – 799.
- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y. 2002. An *F-box* gene linked to the self-incompatibility (*S*) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology*, (50): 29 – 42.
- Lee H S, Huang S, Kao T H. 1994. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 367: 560 – 563.
- Li Wentao, Chetelat R T. 2010. A pollen factor linking inter- and intraspecific pollen rejection in tomato. *Science*, 330 (6012): 1827 – 1830.
- Luu D T, Qin X, Laublin G, Yang Q, Morse D, Cappadocia M. 2001. Rejection of S-Heteroallelic pollen by a dual-specific S-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics*, 159 (1): 329 – 335.
- Mascarenhas J P. 1988. Anther and pollen expressed genes//Verma P S D, Goldberg R B. In temporal and spatial regulation of plant genes. New York: Springer Verlag: 97 – 115.
- McClure B A, Gray J E, Anderson M A, Clarke A E. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, 347: 757 – 760.
- McClure B A, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R. 1999. A small asparagines-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 13548 – 13553.
- McClure B A, Cruz-Barcia F, Beecher B S, Sulaman W. 2000. Factors effecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Journal of Experimental Botany*, 85: 113 – 123.
- Melo F R, Rigden D J, Franco O L, Mello L V, Ary M B, Grossi de S M F, Bloch C J. 2002. Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins*, 48: 311 – 319.
- Murfett J, Atherton T L, Mou B, Gassert C S, McClure B A. 1994. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 367: 563 – 566.
- Pelegrini P B, Lay F T, Murad A M, Anderson M A, Franco O L. 2008. Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins: Structure, Function & Bioinformatics*, 73 (3): 719 – 729.
- Pelegrini P B, Franco O L. 2005. Plant-thionins: Novel insights on the mechanism action of a multi-functional class of defense protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 2239 – 2253.
- Puerta A R, Ushijima K, Koba T, Sassa H. 2009. Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *Journal of Experimental Botany*, 60 (4): 1309 – 1318.
- Romeiro R, Karr A L, Goodman R N. 1981. Isolation of a factor from apple that agglutinates *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*, 68 (3): 772 – 777.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan A L, Wang Y, Dowd P E, McCubbin A G, Huang S, Kao T H. 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, 429: 302 – 305.
- Sims T L, Ordanic M. 2001. Identification of a S-ribonuclease-binding protein in *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology*, 47 (6): 771 – 783.
- Suzuki G, Kai N, Hirose T, Fukui K, Nishio T, Takayama S, Isogai A, Watanabe M, Hinata K. 1999. Genomic organization of the *S* locus: Identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S*⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics*, 3: 391 – 400.
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimamoto H, Che F S, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A. 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (4): 1920 – 1925.
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar A M, Gradziel R M, Tao R, Hirano H. 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed *F-box* gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell*, 15: 771 – 781.
- Wheeler M J, de Graaf B H, Hadjiosif N, Perry R M, Poulter N S, Osman K, Vatovec S, Harper A, Franklin F C, Franklin-Tong V E. 2009. Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature*, 459: 992 – 995.
- Zhao L, Huang J, Zhao Z H, Li Q, Sims T L, Xue Y B. 2010. The Skp1-like protein SSK1 is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Journal*, 62 (1): 52 – 63.