

水通道蛋白在‘丰水’、‘今村秋’花粉萌发中的作用

许 晔, 刘 青, 陈 曦, 徐国华

(江苏第二师范学院生命科学与化学化工学院, 江苏省生物功能分子重点建设实验室, 江苏 南京 210013)

[摘要] 梨花粉在不同渗透压下萌发率会发生变化,用水通道蛋白的抑制剂 HgCl_2 和激活剂 β -巯基乙醇处理‘丰水’、‘今村秋’花粉培养基,会影响花粉萌发率.在培养基中加入浓度低于 0.01% 的 β -巯基乙醇可以提高花粉萌发率、增加花粉管长度,若浓度高于 0.01%, β -巯基乙醇即会对花粉造成毒害作用;加入 $0.001 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HgCl_2 即可降低萌发率,花粉管长度变短,且抑制效果随浓度增高而增强.

[关键词] 水通道蛋白,梨花粉,‘丰水’,‘今村秋’

[中图分类号] Q945.34 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2014)04-0099-06

The Role of Aquaporins in *Housui* and *Imanuraaki* Pollens Germination

Xu Ye, Liu Qing, Chen Xi, Xu Guohua

(Faculty of Life Sciences and Chemistry, Jiangsu Second Normal University, Jiangsu Key Laboratory of Biofunction Molecule, Nanjing 210013, China)

Abstract: The pollen germination rate of *Pyrus* pollen tubes varied at different osmosis pressure. Under the condition of the inhibitor and activator of aquaporins (AQPs), the germination rate of *Housui* and *Imanuraaki* pollens will be affected. The concentration of AQPs activator under 0.01% will increase the germination rate and pollen tube length. Otherwise the activator will be poison to the *Pyrus* pollen. The pollen tube length and germination rate will be reduced when the concentration of AQPs inhibitor reach $0.001 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. At the same time the high level of HgCl_2 will get better effects.

Key words: aquaporins, *Pyrus* pollen, *Housui*, *Imanuraaki*

水通道蛋白(Aquaporins, AQPs)自被发现以来一直广受关注,迄今,已在真细菌、古细菌、动物和植物等几乎所有生物中都有发现,围绕 AQPs 在各个领域的研究现已成为广泛热点^[1-3]. AQPs 在植物中广泛分布,能增加生物膜对水分的通透性,实现水分快速跨膜运输,有效调节细胞内外的渗透平衡^[4],此外, AQPs 还能转运其他的一些中性小分子物质,如甘油、 H_2O_2 、尿素、 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 、 CO_2 以及硼、硅等^[5-10],从而参与并调节植物的一系列重要生理过程^[11],如光合作用、氮代谢、矿质代谢、气孔活动、植物种子萌发、开花、细胞信号转导、胁迫应答和花粉萌发等,在植物生长发育以及逆境应答生理过程中起着重要的作用^[12].

我国梨树栽培历史悠久,资源丰富,目前栽培面积达 100 多万公顷,栽培面积和产量一直居世界首位,其种类和品种繁多,且多数梨品种原产中国而在其他国家没有栽培,因而有很好的品种资源.但是由于梨属植物具有自交不亲和性,所以在梨的生产中需要合理配置授粉树或人工辅助授粉才能保证正常结果,费时费力.已有文献证明^[13],梨自交不亲和主要是通过抑制自花花粉萌发及花粉管伸长实现的.而就目前所知,花粉萌发过程中离不开水分的作用,花粉只有从柱头上吸水才能恢复细胞内酶的活性,进而展开一系列生理生化反应,而 AQPs 对水分子跨膜转运的重要作用提示 AQPs 与植物的自交不亲和性可能存在联系. AQPs 可能参与调节这个生理过程中的水分跨膜运输^[14]进而调节花粉吸水萌发.但 AQPs 在梨花粉萌发以及花粉管生长过程中的作用机制目前尚未明了.因此,本文通过研究 AQPs 对‘丰水’、‘今村秋’花粉萌发率的影响,以期探明 AQPs 在梨自交不亲和反应中的作用机制.

收稿日期:2014-06-26.

基金项目:江苏省高校自然科学基金(11KJB210002)、江苏省大学生实践创新训练计划(201350516012Y)、江苏省高校“青蓝工程”项目.

通讯联系人:徐国华,教授,研究方向:植物生理与分子生物学. E-mail: njxgh@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验以梨品种‘丰水’和‘今村秋’的花粉为材料,采自江苏省南京农业大学园艺场梨品种资源圃.成熟的花药采下包裹于称量纸中,置密闭的硅胶瓶中常温干燥1 d后置-20℃冰箱中保存备用.

1.2 实验方法

1.2.1 花粉培养

花粉萌发率统计按徐国华^[15]、谢鹏^[16]等方法进行:将保存于冰箱中的花粉转移到室温下解冻2 h,在培养皿中加入1 mL培养基(10%蔗糖、20%聚乙二醇4 000、0.01%硼酸和0.03%硝酸钙,溶解于pH 6.5 30 mmol·L⁻¹ MES溶液中),用毛笔蘸取少量花粉均匀洒在培养基表面于暗处预培养45 min.花粉萌发以花粉管长度大于花粉粒直径为准.

1.2.2 不同温度对花粉萌发的影响

在20℃和25℃分别培养花粉,并统计花粉萌发率.

1.2.3 AQPs 激活剂与抑制剂对花粉萌发的影响

在两种花粉的培养基中分别加入10 mmol·L⁻¹、1 mmol·L⁻¹、0.1 mmol·L⁻¹、0.01 mmol·L⁻¹、0.001 mmol·L⁻¹浓度的AQPs抑制剂HgCl₂,统计花粉萌发率,并用显微镜观察花粉萌发情况;加入10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%的AQPs激活剂β-巯基乙醇,统计不同时间的花粉萌发率,并用显微镜观察花粉萌发情况.

1.2.4 数据分析

所有数据均至少重复3次,并用SPSS statistics进行Duncan test分析.

2 结果与分析

2.1 温度对花粉萌发率的影响

由图1可见,25℃时‘丰水’花粉的萌发率随时间的推移而逐渐缓慢升高,而20℃时花粉萌发率在培养6 h时超过25℃的萌发率,之后有所下降,但仍比25℃条件下的萌发率高,本实验主要针对6 h的萌发情况展开,所以将20℃作为‘丰水’的最适培养温度.在20℃时,培养2 h花粉管开始出现,但多数花粉管长度没有大于花粉直径(图3-1),花粉萌发率仅为3.21%.随着培养时间的延长,花粉管逐渐加长,花粉萌发率也比培养2 h时显著提高($p<0.05$)(图3-2、3-3),在培养6 h时达到最高值,是2 h时的12.13倍,培养6 h之后,萌发率开始下降.

由图2可见,20℃时‘今村秋’的花粉萌发率在培养3 h~6 h高于25℃的花粉萌发率,并且20℃的萌发率情况整体较25℃稳定,因此,‘今村秋’品种在本实验中同样将20℃作为最适培养温度.在20℃时,与‘丰水’的趋势相类似,花粉的萌发率在培养6 h内随着培养时间的延长而逐渐显著提高,在培养6 h时达到最高值,比培养2 h时增长了411.49% ($p<0.05$).但是从图1与图2对比可以看出,‘今村秋’的萌发率在培养时间相同的前提下,整体比‘丰水’的低.图3-4、3-5、3-6分别是20℃时‘今村秋’花粉培养2 h、4 h、6 h的萌发情况.

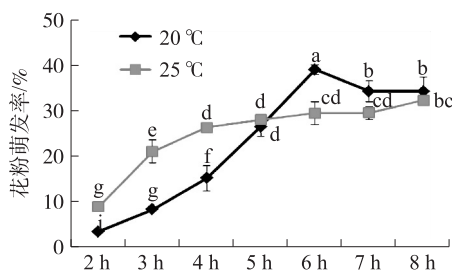


图1 ‘丰水’在不同温度时的萌发率

Fig.1 Effects of temperature treatment on pollen germination rates in *Housui* pears

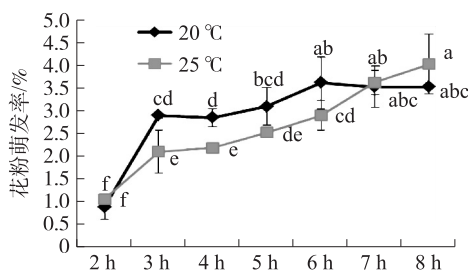


图2 ‘今村秋’在不同温度时的萌发率

Fig.2 Effects of temperature treatment on pollen germination rates in *Imanuraaki* pears

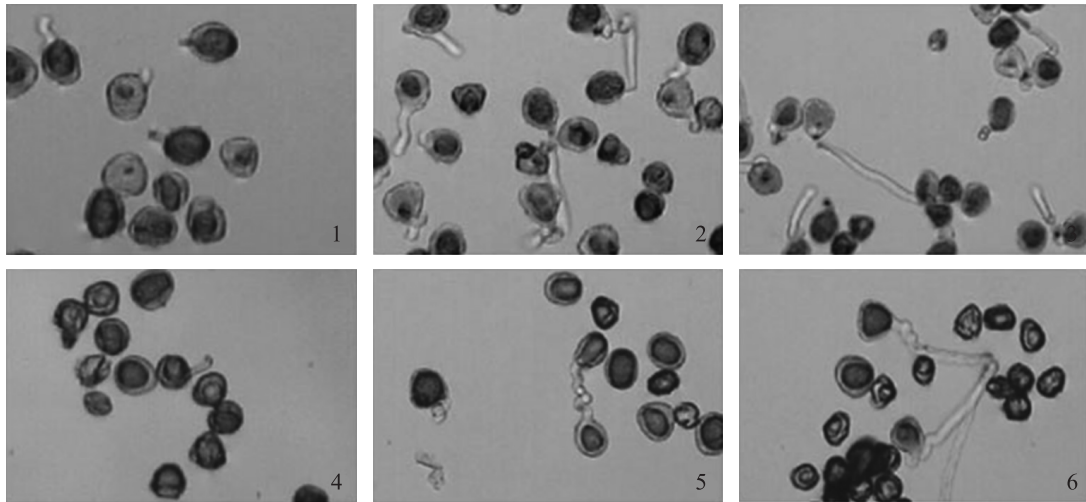


图3 ‘丰水’、‘今村秋’花粉于 20℃ 随时间萌发的情况 (100×)

(a)、(b)、(c) 分别为‘丰水’花粉 2 h、4 h、6 h 的萌发情况; (d)、(e)、(f) 分别为‘今村秋’花粉 2 h、4 h、6 h 的萌发情况

Fig. 3 Germination situations of *Housui* and *Imanuraaki* pollens in 20 °C

(a)、(b)、(c) show germination situations of *Housui* pollens with 2 h、4 h and 6 h treatments; (d)、(e)、(f) show germination situations of *Imanuraaki* pollens with 2 h、4 h and 6 h treatments

2.2 AQPs 激活剂 β -巯基乙醇对花粉萌发率的影响

由图 4 可见,‘丰水’在加入浓度为 0.001%、0.0001% 的 β -巯基乙醇时萌发率比对照组显著提高 ($p < 0.05$), 在加入 0.001% β -巯基乙醇培养 5 h 时, 萌发率最高, 为对照的 5.61 倍. 加入浓度为 0.01% β -巯基乙醇时萌发率有所降低, 2 h ~ 5 h 时与对照组差异不显著, 在 6 h 时显著 ($p < 0.05$) 低于对照组. 当 β -巯基乙醇浓度 $\geq 0.1\%$ 时, 萌发率维持在较低水平, 并且在培养 4 h 后显著 ($p < 0.05$) 低于对照组的萌发率, 浓度增加至 10% 时花粉细胞和花粉管多数变形, 可能是因为 β -巯基乙醇的毒性所致.

由图 5 可见,‘今村秋’在加入浓度为 0.001%、0.0001% 的 β -巯基乙醇时花粉萌发率显著高于对照组萌发率 ($p < 0.05$), 在加入 0.001% β -巯基乙醇培养 5 h 时, 萌发率最高, 比对照增加了 381.12%. β -巯基乙醇浓度为 0.01% 时萌发率降低但仍然显著高于正常值 ($p < 0.05$), 当 β -巯基乙醇浓度继续增高至 0.1% 以上时, 萌发率仅在 2 h 时显著高于对照 ($p < 0.05$), 3 h 开始显著降低 ($p < 0.05$), 10% 时多数花粉细胞和花粉管变形, 可能是因为 β -巯基乙醇的毒性所致.

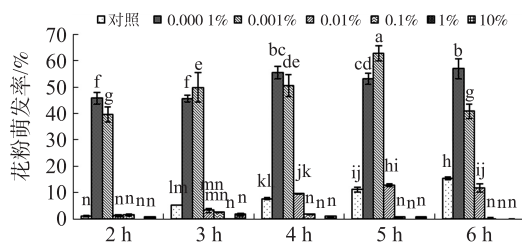


图4 ‘丰水’花粉加入 β -巯基乙醇的萌发率

Fig. 4 Effects of beta-mercaptoethanol treatment on pollen germination rates in *Housui* pears

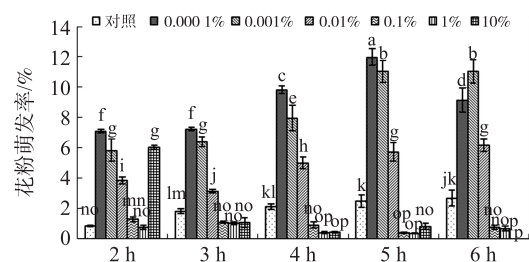


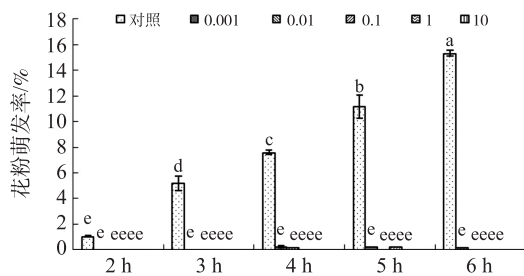
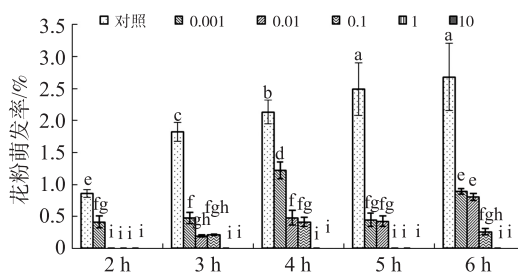
图5 ‘今村秋’花粉加入 β -巯基乙醇的萌发率

Fig. 5 Effects of beta-mercaptoethanol treatment on pollen germination rates in *Imanuraaki* pears

2.3 AQPs 抑制剂 $HgCl_2$ 对花粉萌发率的影响

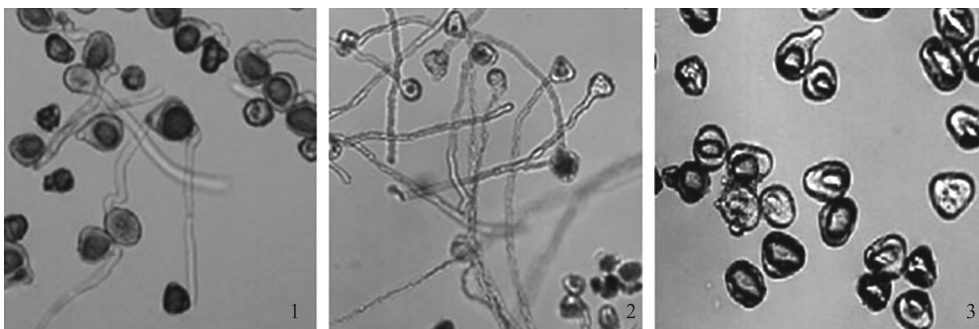
‘丰水’花粉在加入不同浓度的 $HgCl_2$ 后, 花粉萌发率均显著低于对照组 ($p < 0.05$), 当 $HgCl_2$ 浓度增加到 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ‘丰水’花粉在 2 h ~ 6 h 内萌发率为 0 (图 6).

‘今村秋’花粉培养基中加入 $HgCl_2$ 后的萌发率在 2 h ~ 6 h 内比对照均显著降低 ($p < 0.05$), 并且在相同培养时间内, 随着 $HgCl_2$ 浓度的增加, ‘今村秋’花粉萌发率也显著降低 ($p < 0.05$) 直至 0 (图 7), 当 $HgCl_2$ 浓度增加到 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, ‘今村秋’花粉在培养 6 h 以后萌发率仍为 0.

图 6 ‘丰水’花粉加入 HgCl_2 的萌发率Fig. 6 Effects of HgCl_2 treatment on pollen germination rates in *Housui* pears图 7 ‘今村秋’花粉加入 HgCl_2 的萌发率Fig. 7 Effects of HgCl_2 treatment on pollen germination rates in *Imanuraaki* pears

2.4 花粉在不同条件下萌发镜检情况

由预实验可知两种花粉均在 6 h 左右萌发情况最好,故选取 6 h 时花粉萌发镜检照片作为对比.图 8-2 为‘丰水’花粉加入 β -巯基乙醇,花粉管长度比对照(图 8-1)增加,花粉萌发率提高,同时花粉管不如对照中花粉管饱和,形状皱缩.图 8-3 为‘丰水’花粉加入 HgCl_2 ,萌发率比对照(图 8-1)更低,几乎看不到花粉管延长.

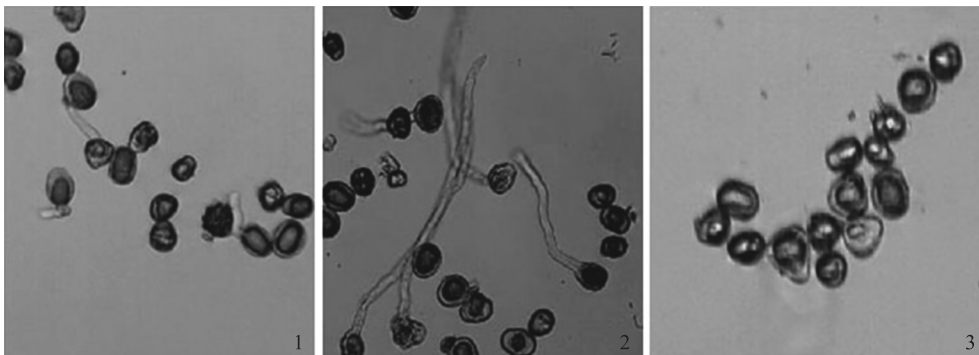
图 8 ‘丰水’花粉在不同条件下培养 6 h 的萌发情况(100 \times)

(a) 对照;(b) ‘丰水’花粉加入 0.001% β -巯基乙醇的萌发情况;(c) ‘丰水’花粉加入 0.001 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HgCl_2 的萌发情况

Fig. 8 Germination situations of *Housui* pollens under different treatments after 6 h(100 \times)

(a) control test, (b) germination situations of *Housui* pollens under 0.001% beta-mercaptoethanol treatments, (c) germination situations of *Housui* pollens under 0.001 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HgCl_2 treatments

与‘丰水’情况相类似,图 9-2 为‘今村秋’花粉加入 β -巯基乙醇的情况,花粉管长度增加且花粉萌发率增加.图 9-3 为‘今村秋’花粉加入 HgCl_2 ,萌发率比对照(图 9-1)更低,未见有花粉管伸长.

图 9 ‘今村秋’花粉在不同条件下培养 6 h 的萌发情况(100 \times)

(a) 对照;(b) ‘今村秋’花粉加入 0.001% β -巯基乙醇的萌发情况;(c) ‘今村秋’花粉加入 0.001 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HgCl_2 的萌发情况

Fig. 9 Germination situations of *Imanuraaki* pollens under different treatments after 6 h(100 \times)

(a) control test, (b) germination situations of *Imanuraaki* pollens under 0.001% beta-mercaptoethanol treatments, (c) germination situations of *Imanuraaki* pollens under 0.001 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HgCl_2 treatments

3 讨论

花粉落到柱头上以后,受到柱头分泌物的刺激,吸水,开始进行水合萌发花粉管。花粉的萌发率和花粉管的伸长直接影响梨自交的效率。随时间的推延花粉萌发率逐渐升高,花粉管长度也逐渐增长,一般在6 h左右达到稳定状态,但期间也会有起伏变化,因为有些花粉管会出现破损情况,且花粉管破损率会随时间推延而提高,因此,在实验中我们主要讨论2 h~6 h的花粉萌发情况。

同时,培养基中含有聚乙二醇,预实验表明,随着聚乙二醇浓度的变化,培养基渗透压会发生改变,花粉萌发率和花粉管长度也会随之变化。说明渗透压的变化与花粉的萌发率变化有直接关系。而AQP_s可以控制花粉中的水分运输和其他小分子的运输,这两者都可以影响花粉的渗透压,因此我们推断AQP_s通过外界条件影响其自身活性,调节花粉中的渗透压,进而影响花粉萌发率和花粉管的伸长。因此,我们在培养基中加入AQP_s的激活剂 β -巯基乙醇和抑制剂 HgCl_2 ,并观察花粉萌发率以及花粉管长度变化。加入不同浓度的 β -巯基乙醇,我们发现0.0001% β -巯基乙醇可以显著增加花粉萌发率,同时使花粉管长度也增加(图5)。当 β -巯基乙醇浓度增加到0.001%时花粉萌发率也很高,但 β -巯基乙醇浓度增加到0.01%时花粉萌发率增加幅度降低,但仍旧高于对照组。由图5可以看到适当浓度的 β -巯基乙醇可将花粉的萌发率提高, β -巯基乙醇浓度逐渐升高,激活能力越强,萌发率越高,这可能与巯基乙醇影响AQP_s活性密切相关。一旦 β -巯基乙醇的浓度达到0.01%,反而会抑制花粉的萌发,这可能与 β -巯基乙醇的自身毒性对花粉产生毒害作用有关^[17]。若在培养基中加入 HgCl_2 ,花粉萌发率降低,花粉管长度减小,甚至不会萌发,低浓度的 HgCl_2 会降低抑制效果,浓度越高,抑制效果越强,这可能是因为 Hg^{2+} 降低AQP_s活性,降低水的通透性。实验证明, Hg^{2+} 对大多数AQP具有抑制作用,其对AQP的抑制作用主要是通过改变蛋白质构象来实现的^[18]。 Hg^{2+} 能诱导氨基酸残基在ar/R区域的定位折叠以及Arg¹⁹⁷和His¹⁸²之间的空间收缩,在自然状态下,Glu¹⁴⁴、Gly¹⁹²和Ile¹⁹³呈线性排列,加入 Hg^{2+} 后,AQP中Glu¹⁴⁴和Ile¹⁹³之间的2个氢键断开,导致了AQP构象的改变,从而使AQP通道孔径过小,水分子无法正常通过。更重要的是,由Gly¹⁹⁰、Cys¹⁹¹、Gly¹⁹²形成的线性结构的折叠使得水分子被阻拦且无法与蛋白质形成氢键^[18]。因而 Hg^{2+} 对大多数AQP_s的抑制作用明显,进而使得花粉萌发率降低直至不萌发。

综上所述,浓度在0.01%以下的 β -巯基乙醇可以提高AQP_s活性,增加水的通透性,提高花粉萌发率,促进花粉管伸长。0.001 mmol L⁻¹ HgCl_2 即可以抑制AQP_s活性,降低水的通透性,减小花粉萌发率,抑制花粉管伸长,并且抑制效果随浓度增加而增强。因此,我们推测:AQP_s通过影响水分子的通透性,进而影响水合萌发花粉管过程,最终导致花粉萌发率变化。

[参考文献]

- [1] Wang L L, Chen A P, Zhong N Q, et al. The lungiella salsuginea tonoplast aquaporin TsTIP1 functions in protection against multiple abiotic stresses[J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(1): 148–161.
- [2] Tzartos J S, Stergiou C, Kilidireas K, et al. Anti-aquaporin-1 autoantibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders[J]. PloS One, 2013, 8(9): e74773.
- [3] Cao X C, Zhang W R, Cao W F, et al. Aquaporin-3 is required for FGF-2-induced migration of human breast cancers[J]. PloS One, 2013, 8(2): e56735.
- [4] Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, et al. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions[J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 595–624.
- [5] Schuurmans J A, van Dongen J T, Rutjens B P, et al. Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies[J]. Plant Mol Biol, 2003, 53(5): 633–645.
- [6] Bienert G P, Moller A L, Kristiansen K A, et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes[J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 1 183–1 192.
- [7] Liu L H, Ludewig U, Gassert B, et al. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2003, 133(3): 1 220–1 228.
- [8] Holm L M, Jahn T P, Moller A L, et al. NH_3 and NH_4^+ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes[J]. Pflugers

- Arch,2005,450(6):415-428.
- [9] Uehlein N,Lovisolo C,Siefritz F,et al. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions [J]. Nature,2003,425(6959):734-737.
- [10] Takano J,Wada M,Ludewig U,et al. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation[J]. Plant Cell,2006,18(6):1 498-1 509.
- [11] 梅杨,李海蓝,杨尚元,等. 植物水孔蛋白的功能[J]. 植物生理学通讯,2007,43(3):563-568.
- [12] 李昌庆,杨致邦,夏丽君,等. 渗透压对痢疾志贺菌水通道蛋白 glpF 基因表达的影响[J]. 中国微生态学杂志,2010(6):514-517.
- [13] 徐义流,张绍铃. 梨配子体型自交不亲和性及其分子机理[J]. 果树学报,2003,20(1):59-63.
- [14] Li G W,Peng Y H,Yu X,et al. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice[J]. J Plant Physiol,2008,165(18):1 879-1 888.
- [15] 徐国华,张绍铃,张超英,等. 梨自花与异花授粉后花粉胞内游离 Ca²⁺ 分布的变化[J]. 植物生理与分子生物学学报,2003,29(2):97-103.
- [16] 谢鹏,谭晓风,李芳东,等. 6个杏李品种花粉量及花粉萌发率测定[J]. 中国南方果树,2009,38(2):34-35.
- [17] 朱美君,陈珈,王学臣. 玉米根细胞质膜水孔蛋白的鉴别、分布及其功能[J]. 科学通报,2000(4):407-411.
- [18] Yoshinori H,Noriaki O,Ikuko K,et al. Molecular mechanisms of how mercury inhibits water permeation through aquaporin-1: understanding by molecular dynamics simulation[J]. Biophysical Journal,2010,98(4):1 512-1 519.

[责任编辑:黄 敏]