

周建涛, 姜雪婷, 李 慧, 等. 钙调素及其抗血清对梨花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 437-441.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.030

## 钙调素及其抗血清对梨花粉萌发和花粉管生长的影响

周建涛<sup>1,2</sup>, 姜雪婷<sup>2</sup>, 李 慧<sup>1</sup>, 蔺 经<sup>1</sup>, 张绍铃<sup>2</sup>

(1. 江苏省农业科学院园艺研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014; 2 南京农业大学梨工程技术研究中心, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 以砂梨品种今村秋及丰水为试验材料, 在离体及活体条件下, 研究了外源施加不同浓度钙调素及其抗血清对梨花粉萌发及花粉管生长的影响。离体培养条件下, 施加  $10^{-7}$  mol/L 钙调素对今村秋花粉萌发及花粉管生长的促进作用最明显, 而稀释 200 倍的钙调素抗血清则有明显的抑制作用。自交不亲和性反应与活体试验结果进一步证实钙调素在梨花粉萌发与花粉管生长过程的促进作用, 而钙调素抗血清的作用与之截然相反, 显著抑制花粉萌发及花粉管生长。说明, 钙调素处理可以有效促进梨自交不亲和过程花粉萌发及花粉管生长。

**关键词:** 钙调素; 梨; 自交不亲和; 花粉特性

**中图分类号:** S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)02-0437-05

## Germination and growth of pear pollen in response to calmodulin and its antiserum

ZHOU Jian-tao<sup>1,2</sup>, JIANG Xue-ting<sup>2</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, LIN Jing<sup>1</sup>, ZHANG Shao-ling<sup>2</sup>

(1. Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China; 2. Pear Engineering Research Centre, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The influences of different concentrations of exogenous calmodulin and its antiserum on the pollen germination and growth of pear were studied on *Pyrus pyrifolia* varieties Imamuraaki and Hosui *in vitro* and *in vivo*. The application of  $10^{-7}$  mol/L calmodulin could promote pollen germination and pollen tube growth *in vitro*, however, 200-times diluted calmodulin antiserum showed inhibitory effect. The functions of calmodulin and its antiserum in pollen germination and pollen tube growth were further proved by selfing incompatibility reaction and *in vivo* experiment. The results suggest that calmodulin treatment can effectively boost pollen germination and pollen tube growth of pear during selfing incompatibility process.

**Key words:** calmodulin; pear; selfing incompatibility; pollen characteristic

梨(*Pyrus*)属于配子体型自交不亲和性果树, 绝大多数品种自花授粉不结实, 在生产上必须合理配置授粉树或者进行人工授粉, 才能获得预期的产量及品质。花粉在柱头上的萌发和花粉管在花柱引导

组织中的伸长及定向生长是一个复杂的过程, 涉及花粉和柱头的相互识别及花粉管与花柱引导组织之间的相互作用<sup>[1]</sup>。研究结果表明花粉或花柱细胞外基质中的多种蛋白质在上述过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>, 如钙调素(Calmodulin, CaM)对花粉萌发和花粉管伸长具有促进作用<sup>[3]</sup>。显微注射试验证实, 提高花柱引导组织中细胞外CaM活性可以促进花粉管在花柱引导组织中的伸长, 而抑制其活性则起相反作用<sup>[4]</sup>。但CaM在自交不亲和性反应过程中对花粉萌发及花粉管生长的影响尚未明确, 因此, 我们

收稿日期: 2015-08-24

基金项目: 国家现代农业(梨)产业技术体系项目(CARS-29)

作者简介: 周建涛(1965-), 男, 博士, 研究员, 主要从事果树种质资源研究。(E-mail) 102949231@qq.com

通讯作者: 张绍铃, (E-mail) nnzsl@njau.edu.cn

采用梨花粉离体及活体培养来研究 CaM 及其抗血清对自交不亲和性反应过程中花粉萌发及花粉管生长的影响,以期进一步了解 CaM 在自交不亲和性反应过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以南京农业大学江浦农场梨品种资源圃砂梨 (*Pyrus pyrifolia* Nakai) 品种今村秋 (Imamuraaki) ( $S_1S_6$ ) 和丰水 (Hosui) ( $S_3S_5$ ) 含饱满花芽的健壮枝条为试验材料。将枝条基部剪成斜面,插入 30 g/L 蔗糖溶液器皿中,置于 25 °C 光照培养箱培养促进花蕾进一步发育。一部分花枝于开花前 1~2 d 采集花蕾,收获花药,用硫酸纸包裹,置于密闭的硅胶瓶中常温干燥 1 d 后贮存于 -20 °C 冰箱中备用;另一部分花枝继续培养至开花用于活体试验。

### 1.2 试验方法

1.2.1 花柱 S-RNase 的提取及活性检测 参照张绍铃等<sup>[5]</sup>的方法提取今村秋及丰水花柱 S-RNase,回收的 RNase 经平衡透析后贮存于 -80 °C 冰箱中备用。RNase 的定量参照 Bradford<sup>[6]</sup>的方法,以牛血清白蛋白作标准曲线。RNase 的活性测定参照 Brown 等<sup>[7]</sup>的方法,比活性单位为 U/mg)。

1.2.2 花粉离体萌发培养 将保存于冰箱中的花粉转移到室温下解冻 2 h,花粉培养基为 10.00% 蔗糖,20.00% 聚乙二醇 4000、0.01% 硼酸,0.03% 硝酸钙,溶解于 30 mmol/L 的 2-(N-吗啡啉)乙磺酸溶液 (pH = 6.5)。CaM ( $10^{-6}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L、 $10^{-8}$  mol/L)、CaM 抗血清 (稀释 50 倍、100 倍、200 倍、400 倍)皆来自河北师范大学生物系。今村秋和丰水花柱 S-RNase (终浓度 1.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 直接添加到花粉培养基中,进行今村秋花粉培养。以不添加任何蛋白质的花粉培养基为对照,于 25 °C 黑暗条件下培养 6 h 后,取花粉培养悬浮液滴加到载玻片上,在光学显微镜下统计花粉萌发率及花粉管长度,每个处理重复 3 次,每个重复观察花粉粒  $n \geq 100$ ,花粉管  $n \geq 60$  根。

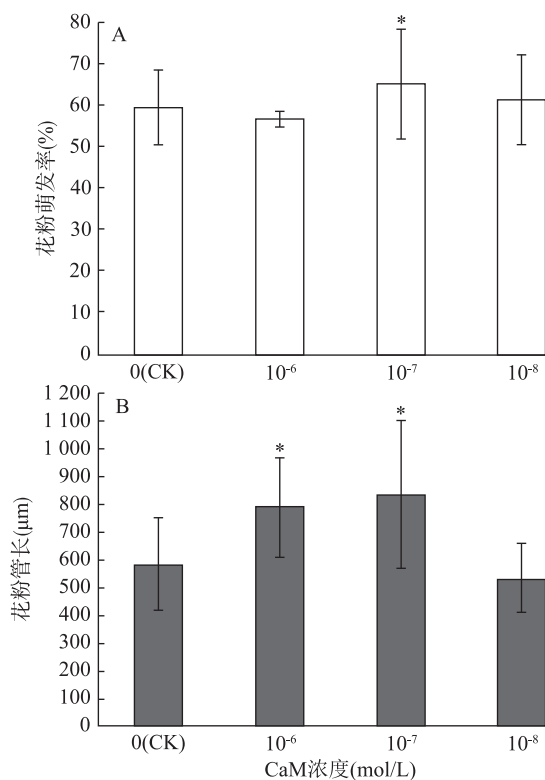
1.2.3 活体培养 将丰水花枝上当天即将开花的花蕾在散粉前去雄,疏去生长较弱的花蕾,花柱处理参照崔素娟等<sup>[8]</sup>的方法,分别用  $10^{-7}$  mol/L CaM 或稀释 200 倍的 CaM 抗血清处理液浸湿的棉球覆盖花柱处理 30 min 后,人工自花授粉 (丰水×丰水) 和

异花授粉 (丰水×今村秋),授粉后立即套袋。采集授粉后 48 h、72 h、96 h 花柱,立即用 FAA 固定液 (福尔马林:冰醋酸:50%酒精混合液 = 5:5:90,体积比)进行固定后备用。参照 Kho 等<sup>[9]</sup>的方法进行软化、苯胺蓝染色、压片处理后,在 XSJ-2 荧光显微镜下观察各处理的花粉萌发及花粉管生长情况,拍照,测量花柱长度及最长花粉管长度,计算比率,每个处理重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 CaM 及 CaM 抗血清处理对今村秋梨花粉离体萌发及花粉管生长的影响

离体试验结果显示,不同浓度 CaM 处理对今村秋梨花粉萌发率有一定的影响 (图 1A),  $10^{-6}$  mol/L CaM 处理后花粉萌发率略低,而  $10^{-7}$  mol/L CaM 处理后花粉萌发率明显升高,与对照存在显著差异,  $10^{-8}$  mol/L CaM 处理对花粉萌发率没有显著影响;

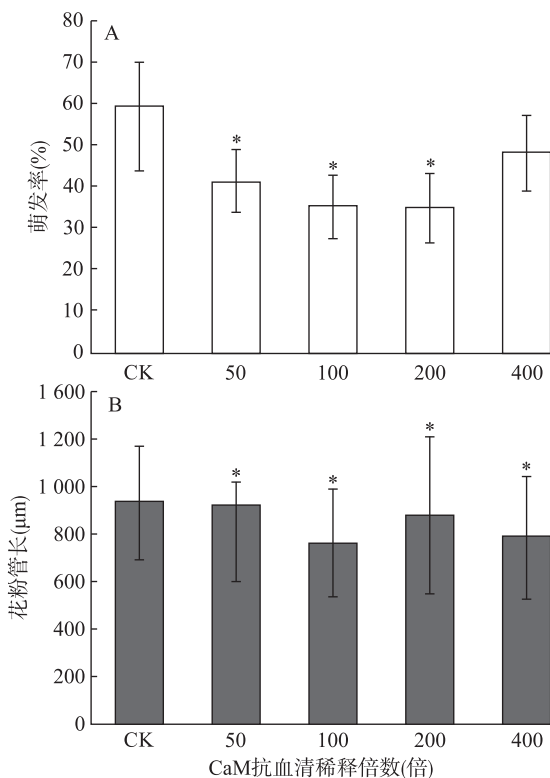


\* 表示处理与对照差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )。

图1 钙调素对今村秋梨离体花粉萌发(A)及花粉管生长(B)的影响

Fig.1 Effect of calmodulin (CaM) treatment on pollen germination (A) and length of *in vitro*-cultured pollen tube (B) of Imamuraaki pear

与此同时,  $10^{-6}$  mol/L 或  $10^{-7}$  mol/L CaM 处理可显著促进花粉管生长, 表现为其长度明显增加, 与对照间存在显著差异, 而  $10^{-8}$  mol/L CaM 处理对花粉管生长无明显效果 (图 1B)。进一步研究揭示, CaM 抗血清处理抑制今村秋梨花粉萌发, 表现为花粉的萌发率显著低于对照 (图 2A), 并且, 花粉的萌发率随着 CaM 抗血清稀释倍数的增加, 呈先降低后升高的趋势, 当 CaM 抗血清稀释 200 倍时, 花粉萌发率最低, 仅为对照的 61.6%; CaM 抗血清对花粉管生长亦存在抑制作用, 其中稀释 100 倍 CaM 抗血清对花粉管生长的抑制效果最为明显, 表现为该处理条件下, 花粉管长度最短, 显著低于对照 (图 2B)。



\* 表示处理与对照差别达到显著 ( $P < 0.05$ )。CK: 不添加 CaM 抗血清。

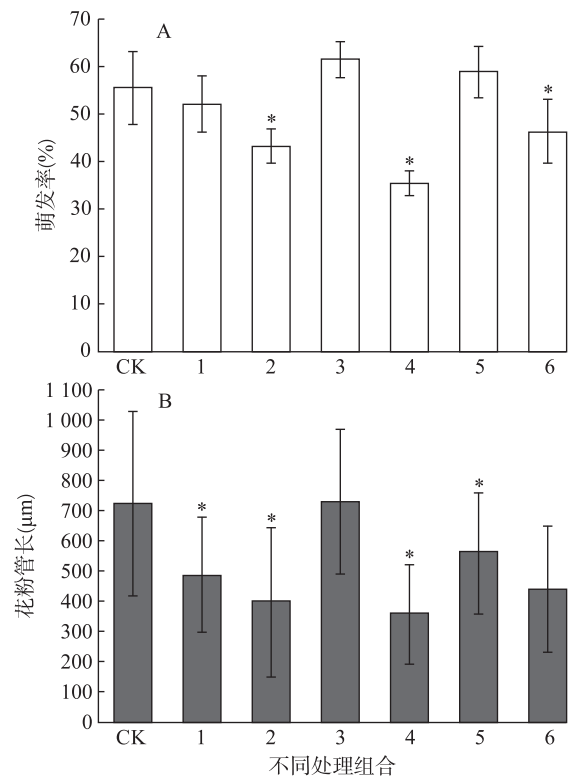
图2 钙调素抗血清对今村秋梨离体花粉萌发 (A) 及花粉管生长 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of anti-CaM serum treatment on pollen germination (A) and length of *in vitro*-cultured pollen tube (B) of Imamuraaki pear

## 2.2 CaM 及 CaM 抗血清与 S-RNase 协同处理对今村秋梨花粉离体萌发的影响

通过离体试验研究 CaM 或 CaM 抗血清与 S-

RNase 协同处理对花粉萌发的影响, 结果 (图 3) 表明: 单独加入丰水 S-RNase (亲和) 对今村秋花粉萌发率没有明显影响, 却显著抑制其花粉管生长; 单独加入今村秋 S-RNase (不亲和) 可以显著抑制今村秋花粉萌发及花粉管生长; 同时施加 CaM 与丰水 S-RNase 或今村秋 S-RNase 都能够促进花粉萌发及花粉管生长, 且 CaM 对今村秋 S-RNase 抑制今村秋花粉萌发与花粉管生长的缓解作用最为明显。此外, 同时施加 CaM 抗血清与丰水 S-RNase 或今村秋 S-RNase 可造成花粉萌发率降低, 但花粉管生长不受影响。



CK: 无任何添加; 1: 丰水 S-RNase; 2: 今村秋 S-RNase; 3: 今村秋 S-RNase+CaM; 4: 今村秋 S-RNase+CaM 抗血清; 5: 丰水 S-RNase+CaM; 6: 丰水 S-RNase+CaM 抗血清。\* 表示处理与对照差异显著 ( $P < 0.05$ )。

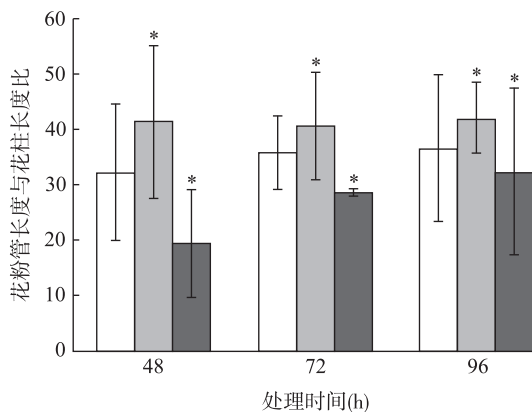
图3 钙调素及其抗血清与 S-RNase 协同处理对今村秋梨花粉萌发 (A) 及花粉管生长 (B) 的影响

Fig.3 Effect of CaM and anti-CaM serum with S-RNase treatment on pollen germination (A) and length of pollen tube (B) of Imamuraaki pear

## 2.3 CaM 及 CaM 抗血清处理对丰水梨活体花柱内花粉管生长的影响

CaM 和 CaM 抗血清处理后丰水梨花粉原位萌发率、生长情况及花粉管长度如图 4、图 5 所示。异

花授粉组的花粉管生长良好,授粉 48 h 后花粉已经生长到底部,因此在图 4 中未显示异花授粉花粉管长度与花柱长度的比例。从图 4 可见,而在整个培养过程(48~96 h)中,施加 CaM 可促使自花授粉组花粉管长度与花柱长度的比例显著升高,而施加 CaM 抗血清后该比例明显下降,表明外源 CaM 处理花柱可以促进自花授粉花粉管伸长;CaM 抗血清对花粉原位萌发及花粉管的伸长起抑制作用。



□对照(无添加);■CaM 处理;■CaM 抗血清处理。\*表示与对照有显著差异( $P < 0.05$ )。

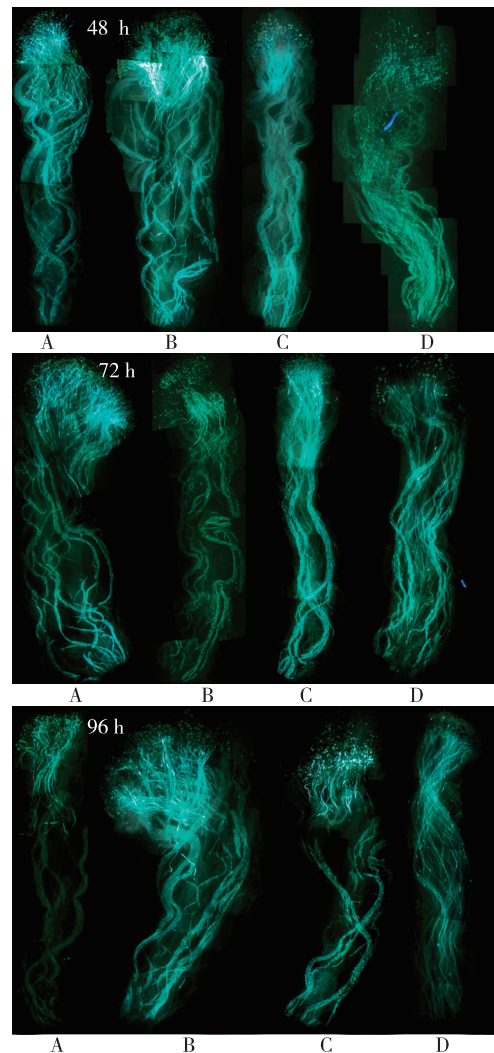
图 4 CaM 和 CaM 抗血清处理对丰水梨自花授粉花粉原位萌发和花粉管生长的影响

Fig.4 The effect of CaM and anti-CaM serum treatment on the length of tube growth *in vivo* self-pollination

自花授粉 48 h 后,CaM 处理的花粉管生长长度与花柱长度的比例由自花授粉的 32.35% 升高至 41.40%,CaM 抗血清处理下降至 19.47%;自花授粉 72 h 后 CaM 处理使花粉管生长长度与花柱长度的比例由 35.82% 升高至 40.68%,CaM 抗血清处理则下降至 28.67%;自花授粉 96 h 后 CaM 处理的花粉管长度比例由 36.57% 升高至 42.13%,CaM 抗血清处理下降至 32.32%。可以看出,CaM 处理在授粉 48 h 后对于花粉管生长的促进作用达到 9.05%,同时 CaM 抗血清的抑制作用为 12.89%,都显著高于 72 h 及 96 h 时的促进或抑制作用。这说明在 CaM 在自交不亲和过程早期的作用效果大于后期。

### 3 讨论

CaM 作为具有多种生理调节功能的钙离子受体之一,是细胞内信号转导途径中的主要信号分子,该物质不仅存在于细胞内,也存在于细胞外<sup>[3]</sup>。外



A: 自花授粉;B: 自花授粉 CaM 处理;C: 自花授粉 CaM 抗血清处理;D: 异花授粉。

图 5 CaM 和 CaM 抗血清处理对丰水梨自花授粉花粉管生长的影响

Fig.5 The effect of CaM and anti-CaM serum treatment on *in vivo* tube growth after self-pollination

源纯化的 CaM 可以促进扁桃、云南松和烟草的花粉萌发及花粉管伸长<sup>[10-11]</sup>,但其作用位点尚未明确。孙大业<sup>[12]</sup>揭示胞外已存在的内源 CaM 可以启动并调控朱顶红花粉萌发和花粉管伸长,外源 CaM 可以促进上述反应。本研究利用 CaM 蛋白处理离体培养的梨花粉,明确该物质对花粉的萌发及花粉管生长有一定的促进作用,而 CaM 抗血清则起抑制作用,表明 CaM 蛋白可能参与了梨花粉萌发的调控过程,这与前人的研究结果<sup>[10-12]</sup>相一致。



CaM 和 CaM 抗血清与 S-RNase 协同作用的活体生长试验结果证明, CaM 在梨自交不亲和性反应过程中起作用, 表现为 CaM 能够缓解不亲和 S-RNase 对花粉萌发和生长的抑制作用, 显著提高花粉萌发率及促进花粉管生长。在花粉萌发与花粉管生长过程中通常发生细胞外的  $\text{Ca}^{2+}$  内流与细胞内钙库释放  $\text{Ca}^{2+}$  等事件, 而 S-RNase 直接影响授粉后花粉及花粉管中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度及分布, 从而调控花粉萌发与花粉管伸长<sup>[3, 13-18]</sup>。从本研究的结果我们可以推测在梨自交不亲和反应过程中, CaM 能够缓解不亲和 S-RNase 的抑制作用, 可能是通过影响  $\text{Ca}^{2+}$  浓度或调节  $\text{Ca}^{2+}$  的分布来实现的。

### 参考文献:

- [1] SHI D Q, YANG W C. Pollen germination and tube growth in Plant Developmental Biology Biotechnological Perspectives [M]. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010:245-282.
- [2] CHEUNG A Y, CHEN C Y, GLAVEN R H, et al. Rab2 GTPases regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the golgi bodies and is important to pollen tube growth [J]. Plant Cell, 2002, 14:945-761.
- [3] Yang X, Wang S S, Wang M, et al. *Arabidopsis thaliana* calmodulin-like protein CML24 regulates pollen tube growth by modulating the actin cytoskeleton and controlling the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [J]. Plant Mol Biol, 2014(3):225-236.
- [4] 周建涛. 外源钙调素对梨自交不亲和性花粉管钙信号的调控作用[D].南京:南京农业大学, 2009.
- [5] 张绍铃, 平塚伸. 梨花柱 S 糖蛋白对离体花粉萌发及花粉管生长的影响[J]. 园艺学报, 2000, 27(4):251-256.
- [6] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [7] BROWN P H, HO T H D. Barley aleurone layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid [J]. Plant Physiology, 1986, 82: 801-806.
- [8] 崔素娟, 王洪海, 马力耕, 等. 花柱和花粉胞外钙调素对花粉萌发和花粉管伸长的影响 [J]. 植物生理学报, 1998, 24(4): 320-326.
- [9] KHO Y O, BEAR J. Observing pollen tubes by means of fluorescence [J]. Euphytica, 1968, 17:298-302.
- [10] POLITO V S. Membrane-associated calcium during pollen grain germination: a microfluorometric analysis [J]. Protoplasma, 1983, 117: 226-232.
- [11] 龚明, 杨中汉, 曹宗巽. 钙调素对花粉萌发和花粉管生长的效应 [J]. 植物生理学报, 1994, 20(3):240-248.
- [12] 孙大业. 植物细胞信号转导研究进展 [J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2):81-91.
- [13] 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  $\text{Ca}^{2+}$  分布的变化 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(2):97-103.
- [14] JIANG X, GAO Y, ZHOU H, et al. Apoplastic calmodulin promotes self-incompatibility pollen tube growth by enhancing calcium influx and reactive oxygen species concentration in *Pyrus pyrifolia* [J]. Plant Cell Rep, 2014, 33: 255-263.
- [15] ZHANG Q S, LI Z, YANG J, et al. Calmodulin-binding protein from rice is essential to pollen development [J]. J Plant Biol, 2012, 55:8-14.
- [16] BOURSIAIC Y, HARPER J F. The origin and function of calmodulin regulated  $\text{Ca}^{2+}$  pumps in plants [J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39:409-414.
- [17] ASQUINI E, GERDOL M, GASPERINI D, et al. S-RNase-like sequences in styles of Coffea (Rubiaceae). Evidence for S-RNase based gametophytic self-incompatibility [J]. Trop Plant Biol, 2011, 4: 237-249.
- [18] WANG L, LV X, LI H, et al. Inhibition of apoplastic calmodulin impairs calcium homeostasis and cell wall modeling during Cedrus deodara pollen tube growth [J]. PLoS ONE, 2013, 8:e55411.

(责任编辑:陈海霞)