

响应。观察到了尼古丁本身具有直接的致癌性。这一成果在美国《Radiocarbon》杂志发表后,亚利桑纳大学新闻处称赞此成果“如此重要和令人激动”,并向媒介和万维网发布了详细消息。测定了尼古丁与基因表达关系密切的核内组蛋白(H1和H3)的加合作用,观察到了加合的剂量响应,还进行了体外的化学反应的CD、UV和荧光谱学研究。加合物的测量灵敏度达到1个加合物/ 10^{10} DNA,与美国接近。尼古丁和组蛋白的测量灵敏度高达4.7个加合物/ 10^{12} 氨基酸残基。

此外,他们还将AMS技术用于大气气溶胶来源研究,建立了适合环境样品AMS分析的制样系统,

对不同地区大气气溶胶和表土中含碳组分的 ^{14}C 同位素进行了AMS分析。结合多元统计分析方法发现大气气溶胶含碳组分与微量元素组分具有不同的来源特征。将AMS方法与多元统计分析方法相结合,能够更全面地认识大气气溶胶的来源特征。成功建立了适合各种甲烷浓度的C同位素分析的采样、分离、提纯、浓缩及制样系统,并应用于大气甲烷和各种甲烷源甲烷的 ^{13}C 同位素分析,首次得出我国各主要甲烷源的甲烷 ^{13}C 同位素组成特征值,并对华北地区大气甲烷的来源进行了分析,初步给出中国甲烷源清单及大气甲烷 ^{13}C 同位素组成的权重平均值。

MODERN NUCLEAR ANALYTICAL TECHNIQUES IN ENVIRONMENTAL SCIENCE

Chai Zhifang

(Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100080)

Key words modern nuclear analytical techniques, environmental sciences

·成果简介·

显花植物自体 and 异体花粉识别分子机理

薛勇彪

(中国科学院发育生物学研究所植物遗传和发育实验室,北京100080)

[关键词] 自交不亲和性, S核酸酶, 花粉S基因

显花植物受精的实现涉及许多细胞间的相互识别事件。因为卵细胞包裹在位于子房内的一种称为胚珠的结构内,携带精子细胞的花粉必须首先能在柱头上萌发,然后在花柱中生长,最后将精子细胞输送到胚珠实现受精。可是,在许多雌雄同花的显花植物中,自花受精常常受一种称为自交不亲和性(self-incompatibility,简称SI)的种内生殖障碍所抑制。在绝大多数自交不亲和植物中,其在遗传上由具有复等位基因的单一位点控制,称为S位点,又称

为单位点自交不亲和性。有些植物具有双位点或多位点自交不亲和性。S位点所包括的S复等位基因数目可达数十甚至上百个,是目前植物中含复等位基因数最多的遗传位点,与动物的主要组织相容性MHC和真菌的交配位点相似。此外,根据含不同S等位基因花的形态,SI可分为同型(homomorphic)和异型(heteromorphic),前者含不同S等位基因植株间花的形态没有区别,而后者则不相同。同型自交不亲和植物又以花粉SI的遗传控制方式的不同分为

配子体型 (gametophytic) 和孢子体型 (sporophytic)。异型自交不亲和性的遗传方式一般为孢子体型。异形自交不亲和性的遗传方式一般为孢子体型。由于对异型自交不亲和性的研究较少,另外,由于篇幅有限,这里主要介绍近年来对同型配子体型自交不亲和性的研究结果和发展方向。关于同型孢子体型和双基因配子体型自交不亲和性的进展见文献[1]。

1 配子体自交不亲和性

在配子体型自交不亲和性植物中,其花粉自交不亲和表型取决于自身的单倍体 S 等位基因。通常不亲和花粉可在柱头表面萌发,但在花柱引导组织的上部花粉管的生长受到抑制,在此不亲和花粉管停止生长。茄科、蔷薇科、玄参科等的自交不亲和性常表现为配子体型。

对配子体自交不亲和性的生物化学的研究开始于 50 年代初期, Lewis 等人^[2]在月见草 (*Oenothera organensis*) 中发现与特定 S 等位基因相关的蛋白质。但是,直到 70—80 年代,研究人员才从茄科等植物中发现含量丰富并与 S 位点遗传连锁的花柱糖蛋白。通过设计与这些糖蛋白 N-端序列同源的寡核苷酸探针分离基因的方法,1986 年, Anderson 等从烟草 (*Nicotiana glauca*) 中第一次分离到配子体型自交不亲和基因——S₂。迄今为止,已从茄科、蔷薇科、玄参科的多种植物中分离出近百个 S 基因根据 DNA 序列分析,其蛋白质产物与真菌的一类核酸酶 Rh 和 T₂ 具有同源性^[8],且含同样活性部位,因其具有核酸酶活性,故而常称为 S-核酸酶^[9]。

S-核酸酶一般长 250 氨基酸左右,分为保守区和多变区 2 个部分^[10],根据茄科 S-核酸酶结构常将保守区分为 C₁ 至 C₅ 五个区域,其中 C₁、C₄ 和 C₅ 是疏水区,与其三维结构有关;C₂ 和 C₃ 为亲水区,可能为酶的活性部位,但近来研究表明蔷薇科和玄参科的 S-核酸酶 C₄ 区并不保守^[6,7](图 1)。多变区可分为 HVa 和 HVb 两个区域,可能是 S-核酸酶具有识别功能的部位。

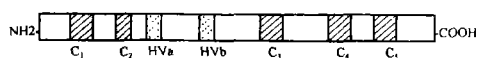


图 1 S-核酸酶结构示意图

C1—5 为保守区;HVa 和 HVb 为多变区

S-核酸酶表达受发育调控,主要分布在花柱引导组织的细胞间隙中,在花柱上 1/3 以下的部位浓

度最高,该部位正是自交不亲和花粉管生长发生抑制的区域,而且其表达也与花柱接受花粉能力的产生在时间上保持一致^[6,11]。McClure 等^[12]用³²P 活体标记花粉 RNA 发现,异交 24 h 后标记的总体 RNA 基本上没有变化,但自交后花粉管中 rRNA 则被降解掉。表明在活体情况下,S-核酸酶的作用具有选择性,并只是在自交后才有酶活性。除此之外,通过定点突变活性部位或反义 RNA 实验发现^[13,14],带有失活 S-核酸酶基因的转基因膨大矮牵牛 (*Petunia inflata*) 丧失抑制含正常的与转基因相同 S 基因型的花粉萌发或花粉管生长的能力,而且,与反义基因相同的宿主 S 基因的正常功能也受到抑制。同时,将与宿主所含 S 基因不同的 S 核酸酶基因转入植物后,后者表现出抑制携带与其相同 S 基因的花粉管的生长。这些结果说明 S 核酸酶直接参与了花柱对自体或携带与其相同 S 基因花粉生长的抑制。

通过反义 RNA 实验和功能获得性实验,不仅提供了 S-核酸酶参与自交不亲和反应的直接证据,而且也表明 S-核酸酶与控制花粉 SI 的基因(花粉 S 基因)无关。因此,S-核酸酶如何作为花柱 S 基因产物参与识别花粉 S 基因是目前的研究热点之一。通过相互置换 S-核酸酶的不同结构区构建嵌合 S-核酸酶基因在花烟草中进行转基因实验^[15]发现,尽管所构建的 S-核酸酶具有酶活性,但其识别功能丧失,表现为自交亲和,不能抑制任何 S 基因型的花粉。但是,Matton 等^[16]利用 *Solanum chacoense* 中两个高度同源的 S 基因——S₁₁ 和 S₁₃(它们的表达产物只有 10 个氨基酸的差异,且有 4 个分布在 HVa 或 HVb 区域),将 S₁₁ 的高变区置换成与 S₁₃ 一致,获得 S₁₁-HVab 突变体(消除位于 HVa 和 HVb 的 4 个氨基酸差异),利用其进行转基因实验,发现转基因植株丧失了抑制 S₁₁ 花粉的功能,但却获得了抑制 S₁₃ 花粉的能力,从而很大程度上证实 S-核酸酶的高变区介导特异性的花粉识别。他们的另一个实验证明突变了 S₁₁ 核酸酶基因 HV 之外的区域的 S-核酸酶基因使转基因植物拒绝 S₁₁ 和 S₁₃ 的花粉,这增加了这一结论的可信度。但是,是否高变区足以决定 S-核酸酶的特异性,还是 S 核酸酶的其他区域也参与了特异性的表达,还有待于进一步的实验证实,比如搞清 S-核酸酶的晶体结构及分离花粉 S 基因产物等工作将有助与回答这些问题。

目前,以茄科植物为代表的配子体型的自交不亲和性作用的模型认为 S 位点花粉特异性表达可能受控于一种核酸酶抑制因子,这种因子不抑制相

同 S 等位基因编码的 S 核酸酶活性,但抑制不同 S 等位基因编码的 S 核酸酶活性^[1,17]。这个模型不仅可以解释自交亲和和花粉突变体的产生^[18],也可以解释配子体型自交不亲和的二倍体植物加倍变成四倍体后产生自交亲和的现象(图 2)^[1]。同时,可以推测突变花粉 S 基因可能造成花粉管不能在含有 S

核酸酶活性的花柱中生长。因此,常规的直接筛选花粉 S 基因突变体的方法,不可能分离到花粉 S 基因本身的突变。事实上,我们通过常规突变实验得到一个花粉 S 突变体就是由于不同 S 等位基因的重复造成的。

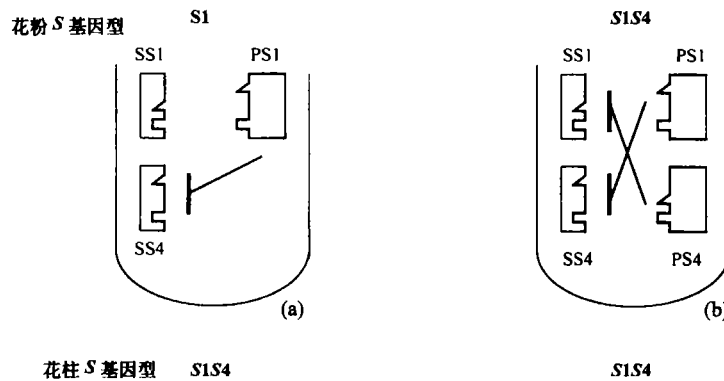


图 2 花粉 S 基因编码核酸酶抑制因子的模型和四倍体植株产生二倍体亲和花粉的示意图

PS1 和 PS4 代表花粉 S 基因产物;SS1 和 SS4 为花柱 S 基因的产物;(a)在正常的单倍体花粉管内 PS1 可以抑制 SS4,但对 SS1 无抑制作用。后者则发挥核酸酶的作用,降解 RNA,造成花粉管生长抑制,即自交不亲和;(b)在四倍体植株产生的杂和二倍体花粉管中,两个不同的花粉 S 基因产物对进入花粉管的两种不同花柱 S 核酸酶发生交叉抑制,因此,核酸酶活性丧失,RNA 不被降解,花粉管生长正常,即自交亲和。花柱 S 核酸酶如何进入花粉管目前还不清楚

2 花粉 S 基因的克隆

鉴于花粉 S 基因编码核酸酶抑制因子和突变后产生配子体致死的可能性,分离该基因需采取一种间接的方法。我们试图利用位点选择性的方法首先突变金鱼草 S 核酸酶基因,并以此为基础分离和鉴定 S 位点编码的基因,从中筛选金鱼草花粉 S 基因。同时,利用分子标记和图位克隆的方法,构建 S 位点的物理图和分离 S 位点内花粉表达的基因,达到克隆金鱼草花粉 S 基因的目的。

2.1 S 位点选择性的转座子突变

DNA 转座子常常转位到与其连锁的遗传位点。这一特性为利用与其连锁的转座子突变目的基因提供了基础。假如转座子与目的基因足够近的话,可以利用目的基因和转座子特异的引物通过 PCR 方法扩增出一个片段。因为 PCR 的灵敏度高,可以用单个的 PCR 反应筛选大批量的植株。同时,利用目的基因为探针检测 PCR 产物的有无,大大增加了筛选转座子插入目的基因事件的灵敏度。这种突变目的基因的方法就是位点选择性的转座子突变。它也是目前植物功能基因组学(functional genomics)中常用的一种方法。

通过遗传杂交实验,获得了含有金鱼草 S 位点

(S_2 和 S_4)和一个活跃转座子连锁的重组子,并证明两者的遗传距离约为 3 cM。进一步的分子遗传学的实验证明这个转座子为 $Tam5$,并且在重组子中很活跃,其配子切除(germinal excision)的频率为 30%—40%。由于重组子携带一个自交亲和的等位基因 Sc ,它可以自交产生后代。通过筛选大批重组子的后代植株,可获得转座子插入到 S 核酸酶基因的突变体。

获得 $Tam5$ 插入失活 S 核酸酶基因突变体后,将以此为材料进一步筛选插入花粉 S 基因的突变体。有证据表明, S 核酸酶基因与花粉 S 基因不同,而且 S 核酸酶基因的失活可以产生自交亲和性^[14]。通过筛选这类植株的后代,寻找恢复为自交不亲和的植株。由于金鱼草很容易通过扦插的方法来繁殖,如此获得的自交不亲和突变体可以通过这种方式来保持。在排除不亲和性不是由于 S 核酸酶基因功能的恢复和影响雄配子体本身发育的基因的突变造成的情况下,进一步通过遗传杂交的方法,确认自交不亲和性的产生是由于花粉 S 基因的突变。然后通过常规的转座子标定法分离突变影响的基因。

获得花粉 S 基因后,可以比较它们的相似性和多态性,寻找保守区域,并设计与此相应的引物,通

过 PCR 的方法,分离更多的花粉 S 基因。同时,利用转座子突变产生的不同等位基因,比较花粉 S 基因不同部位的功能。

2.2 利用分子标记和图位克隆法分离花粉 S 基因

许多证据表明 S 位点具有 DNA 序列多态性的特征^[19]。据此,我们将结合分离体集团分析法(bulk segregant analysis)和 AFLP 的方法,从基因组 DNA 和花粉 cDNA 中分离和筛选与 S 位点连锁,并在花粉内特异表达的基因。然后,结合 S₂ 和 S₄ 等位基因的 BAC (bacterial artificial chromosome) 克隆重叠群(contigs),建立 S 位点的物理图谱。进而,通过上述描述的位点选择性转座子突变的方法,插入失活位于 S 位点内并在花粉内表达的基因,鉴定它们与花粉 S 基因的关系,最终找到花粉 S 基因。

3 前景和展望

许多控制植物自交不亲和雌蕊特异性的基因已经得到分离和鉴定。通过 S 基因多态性分析、不同转基因试验、S-基因产物结构研究等,使得花柱或柱头识别和抑制自体花粉的生长的分子机制以及自交不亲和性的进化有了一定了解。但是,真正搞清这一机制还有待于分离花粉 S 基因产物。有可能,在金鱼草中 S 位点选择性的转座子突变和图位克隆技术是克隆花粉 S 基因的可行方法。

花粉 S 基因的分离是国际上自交不亲和性的研究焦点,目前还没有从任何自交不亲和中分离到此类基因。它们的分离可以说是这一领域的一个重大突破,具有划时代的意义。花粉 S 基因的获得及其与 S 核酸酶作用机理的研究结果,不仅可以阐明显花植物自体 and 异体花粉识别的分子机制,而且也具有潜在的重要应用前景。

参 考 文 献

- [1] 任东路,张燕生,薛勇彪. 自交不亲和性的分子机制,植物科学进展,1998, 1:95—106.
[2] Lewis D. Serological reactions of pollen incompatibility substances.

- Proc. Roy. Soc. (Lond.) B, 1952, 140:127—135.
[3] Ai Y et al. Self-incompatibility in *Petunia inflata*: Isolation and characterization of cDNAs encoding three S-allele-associated proteins. Sex. Plant Reprod, 1990, 3:130—138.
[4] Kaufmann H et al. Sequence variability and gene structure at the self-incompatibility locus of *Solanum tuberosum*. Mol. Gen. Genet, 1991, 226:457—466.
[5] Xu B et al. Cloning and sequencing of cDNAs encoding two self-incompatibility associated proteins in *Solanum chacoense*. Mol. Gen. Genet., 1990, 224:341—346.
[6] Xue Y et al. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNase. Plant Cell, 1996, 8:805—814.
[7] Sassa H et al. Self-incompatibility(S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. Mol. Gen. Genet, 1996, 250:547—557.
[8] Kawata Y et al. Amino-acid sequence of ribonuclease T₂ from *Aspergillus oryzae*. Eur. J. Biochem, 1988, 176:683—697.
[9] McClure B A et al. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases, Nature, 1989, 342:955—957.
[10] Joerger T R et al. Polymorphism at the self-incompatibility locus in *Solanaceae* predates speciation, Proc. Natl. Acad. Sci., 1990, 87:9732—9735.
[11] Cornish E C et al. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. Nature, 1987, 329:99—102.
[12] McClure B A et al. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. Nature, 1990, 347:757—760.
[13] Huang S et al. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. Plant Cell, 1994, 6:1021—1028.
[14] Lee H-S et al. S-proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. Nature, 1994, 367:560—563.
[15] Zurek D et al. Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition. Plant J., 1997, 11:797—808.
[16] Matton D P et al. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. Plant Cell, 1997, 9:1757—1766.
[17] Dodds P N et al. A molecular perspective on pollination in flowering plants. Cell, 1996, 85:141—144.
[18] Lewis D. Structure of the incompatibility gene. III, types of spontaneous and induced mutations. Heredity, 1951, 5:399—414.
[19] Ebert P R et al. Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. Cell, 1989, 56:255—262.

MOLECULAR BASIS OF SELF AND NON-SELF POLLEN RECOGNITION IN FLOWERING PLANTS

Xue Yongbiao

(Plant Genetics and Development Laboratory, Institute of Developmental Biology, CAS, Beijing 100080)

Key words self-incompatibility, S RNases, pollen S gene