

# 甘蓝自交不亲和性相关基因 *BoPLL* 的克隆、定位与表达分析

罗绍兰<sup>1</sup>, 蒲 敏<sup>1</sup>, 曾 静<sup>1</sup>, 施松梅<sup>2</sup>, 廉小平<sup>2</sup>, 王玉奎<sup>1</sup>, 白晓璟<sup>1</sup>,  
张贺翠<sup>1</sup>, 朱利泉<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716; <sup>2</sup>西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

**摘 要:** 对高度自交不亲和甘蓝柱头进行自花授粉和异花授粉处理后, 取柱头进行蛋白质表达谱的比较研究, 获得一种受自花授粉诱导下调表达, 异花授粉诱导上调表达的蛋白, 命名为 BoPLL。进一步分析转录组数据发现, *BoPLL* 在自花授粉 0~30 min 上调表达, 30~60 min 下调表达, 而在异花授粉 0~60 min 一直上调表达。克隆获得 cDNA 为 1 212 bp, 编码含 403 个氨基酸残基的蛋白质 BoPLL。序列分析发现 BoPLL 含有高度保守的 PASTA 结构域和 CMM-10 结构域、中度保守的 PbH1 结构域、低度保守的 HYDRO 结构域, 说明该蛋白是典型的 PLL 家族蛋白。染色体定位结果表明, 该基因与自交不亲和性相关基因不连锁。进化分析表明, 甘蓝 *BoPLL* 与拟南芥 *AtPLL* 亲缘关系最近, 与苜蓿 *MtPLL* 亲缘关系较远。RT-PCR 发现, *BoPLL* 在甘蓝花粉和柱头中表达, 且柱头中的表达量明显低于花粉, 在叶片、花蕾、萼片和花瓣中均没有检测到表达信号。荧光定量 PCR 结果显示, *BoPLL* 在自花授粉和异花授粉 15~60 min 的表达变化趋势与转录组分析结果基本一致。根据上述结果推测 *BoPLL* 可能是一种参与甘蓝自交不亲和反应过程的基因。

**关键词:** 甘蓝; *BoPLL* 基因; 基因克隆; 定位; 表达分析

中图分类号: S 635

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 01-0085-12

## Molecular Cloning, Location and Expression Analysis of *BoPLL* in Self-incompatibility *Brassica oleracea*

LUO Shaolan<sup>1</sup>, PU Min<sup>1</sup>, ZENG Jing<sup>1</sup>, SHI Songmei<sup>2</sup>, LIAN Xiaoping<sup>2</sup>, WANG Yukui<sup>1</sup>, BAI Xiaojing<sup>1</sup>,  
ZHANG Hecui<sup>1</sup>, and ZHU Liquan<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China; <sup>2</sup>College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** The stigmas were from collected self-pollination and cross-pollination of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. and were used to analyze protein expression profiles. We obtained a protein that was down-regulation expression in self-pollination and up-regulation in cross-pollination treatments, which was named BoPLL. Moreover, transcriptomic analysis also showed *BoPLL* was up-regulated at 0 – 30 min and down-regulated at 30 – 60 min in self-pollination process, while it was up-regulated in cross-pollination

收稿日期: 2017-08-12; 修回日期: 2017-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572127); 西南大学基本科研业务费专项资金项目 (XDJK2016E079)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhuliquan@swu.edu.cn)

process. The CDS of *BoPLL* was 1 212 bp in length, encoding 403 amino acids of BoPLL. Sequence analysis found BoPLL contained a high conserved PASTA domain and a CMM-10 domain, moderate conserved PbH1 domain, and a low conserved HYDRO domain, indicating it was a typical PLL protein. Chromosomal location displayed that *BoPLL* is not linked with *S* locus genes. Phylogenetic tree analysis showed that *Brassica oleracea* L. BoPLL was more close to *Arabidopsis thaliana* AtPLL rather than *Medicago truncatula* MtPLL. RT-PCR analysis found *BoPLL* was predominantly expressed in pollen and stigma, with lower expression level of *BoPLL* in pistil than pollen, and no expression in leaf, flower bud, sepal and petal. qRT-PCR analysis revealed that the mRNA in 15~60 min expression patterns of *BoPLL* was similar with the RNAseq analysis. Based on those results, we speculated that *BoPLL* was involved in SI response in *B. oleracea*.

**Keywords:** *Brassica oleracea*; *BoPLL*; gene cloning; location; expression analysis

自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 甘蓝柱头能特异性识别、排斥自花花粉, 接受异花花粉。甘蓝 SI 涉及柱头和花粉相互识别引发的信号传导途径。甘蓝自交不亲和性的产生不仅与 *S* 位点基因编码蛋白有关 (Goring et al., 1993; Nasrallah et al., 1994), 同时还受其他蛋白的调控, 如 ARC1、THL1/THL2、MLPK 等 (朱利泉和周燕, 2015), 这些蛋白的编码基因虽然不与 *S* 位点连锁, 但对于自交不亲和至关重要, 它们也是 SI 的功能分子。目前对于这些蛋白元件在自交不亲和反应中的功能研究较多, 而通过影响花粉管生长进而调控自交不亲和的分子机制尚不清楚。花粉在柱头上萌发过程中, 降解果胶质的酶具有水解花粉和柱头细胞壁, 促进花粉在柱头上萌发的作用 (Suen et al., 2003; Jiang et al., 2014a); 在花粉管生长过程中, 这些酶具有破坏花粉管细胞壁结构, 促进花粉管伸长的作用 (Suen & Huang, 2007; Jiang et al., 2014b)。但是这些降解果胶质的酶是否在甘蓝 SI 过程中发挥作用, 相互间是否存在联系, 都值得深入研究。

本试验中通过对 SI 甘蓝柱头进行蛋白质表达谱的比较研究, 克隆得到 *BoPLL* (*Brassica oleracea* Pectate Lyase Like) 基因, 进一步进行转录组数据分析、生物信息学分析、染色体定位和 QRT-PCR 分析, 旨在为深入研究 SI 信号传导途径提供新的内容。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

甘蓝自交不亲和系 ‘A4’ 和 ‘F1’ 由西南大学十字花科研究所提供, 种植在实验基地隔离网内。2016 年 3 月底至 4 月初, 选取长势一致的 ‘A4’ 花蕾, 于开花当天人工去雄, 用成熟的 ‘A4’ 和 ‘F1’ 花粉对 ‘A4’ 进行自花和异花授粉处理。分别取未授粉柱头和自花、异花授粉 3~5、15、30 和 60 min 的柱头, 立刻放入液氮速冻保存。同时取叶片、花蕾、萼片、花瓣、花药和柱头于 -80 °C 保存备用。

### 1.2 蛋白质双向电泳及质谱鉴定

利用非线性 IPG 固相胶条 (17 cm, pH 3~10) 对甘蓝 ‘A4’ 自花授粉和异花授粉 3~5 和 60 min 后柱头总蛋白质进行双向电泳。采用 TCA/丙酮法提取柱头总蛋白质 (Zou et al., 2009), 参照陈松等 (2013) 方法分离蛋白质, 银染后扫描。选取 3 张重复性较好的 2-DE 图像, 利用 PDQuest 8.0 软

件 (Bio-Rad 公司) 分析和筛选差异表达蛋白质点, 根据 PDQuest 软件中 Quantity table report 值统计 3 个生物学重复图像的平均值, 计算相对变化量。从 SDS-PAGE 胶上切下差异表达蛋白质点送北京华大基因公司进行质谱鉴定。

1.3 SI 甘蓝自花、异花授粉后柱头转录组数据分析

根据蛋白质谱结果, 进一步采用授粉处理 60 min 之内的柱头进行转录组分析。分别将未授粉柱头和自花授粉后 15、30 和 60 min; 异花授粉后 15、30 和 60 min 的柱头提取总 RNA, 送北京百迈克公司用 HiSeq 2000 进行转录组测序, 利用 Trinity 软件对各样品数据进行 Unigenes 组装, 通过 RPKM 值 (Reads per kilo bases per million reads, 每百万 reads 中来自于某基因每千碱基长度的 reads 数) 来反映 Uigenes 表达丰度, 使用 IDEG6 软件进行差异表达基因的检测, 以 log<sub>2</sub> (不同时期 RPKM 比值) 绝对值大于等于 1 为标准统计差异表达基因, 通过 Blast 软件将差异表达 Unigenes 序列与 NR、NT、GO、COG、KEGG、SwissProt 和 TrEMBL 数据库比对, 获得 Unigenes 注释信息, 通过检索芸薹属数据库 (网址 [http://brassica.nbi.ac.uk/BrassicaDB/blast\\_form.html](http://brassica.nbi.ac.uk/BrassicaDB/blast_form.html)) 找到其同源基因序列, 并在差异表达基因中找到 *BoPLL* 基因, 分析其在自花、异花授粉 0、15、30 和 60 min 的表达量变化情况。

1.4 *BoPLL* 的克隆

根据蛋白质双向电泳和转录组测序获得的 cDNA 序列, 结合芸薹属数据库 (网址 [http://brassica.nbi.ac.uk/BrassicaDB/blast\\_form.html](http://brassica.nbi.ac.uk/BrassicaDB/blast_form.html)), 用 Primer primer6.0 软件设计引物: *BoPLL*-F、*BoPLL*-R (表 1)。分别以甘蓝叶片 gDNA 和自花授粉 30 min 柱头 cDNA 为模板, 利用 PrimerSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa, 北京) 25 μL 反应体系 PCR 扩增 *BoPLL* 的编码序列。反应程序: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 延伸 55 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。PCR 产物经 1 × 10<sup>4</sup> mg · L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收后与 pEASY<sup>®</sup>-Blunt 克隆载体 (全式金, 北京) 连接, 产物转化大肠杆菌 DH5α, 经菌落 PCR 鉴定后挑取阳性克隆送北京华大基因公司进行测序。

表 1 基因克隆及其荧光定量 PCR 分析所用引物  
Table 1 Primers used for gene cloning and analysis of real-time PCR

用途 Use	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')
扩增 cDNA 全长 For the full length cDNA	<i>BoPLL</i> -F	ATGACTTGCATTGCTTCTGC
	<i>BoPLL</i> -R	TCAGTTCAGGCAATGCTGAG
荧光定量 PCR 引物 Primers for real-time PCR	RT-PCR-F	CTTCTCATCGTGTCTTAAACACAT
	RT-PCR-R	CGTTCCTTTCGGTACGTAGAT
扩增内参基因 For the internal control	Actin3-F	GAGTAGAAAATGGCTGATGGTGAAG
	Actin3-R	TCATCTTCTACGGTTAGCCTTTG

1.5 *BoPLL* 的染色体定位

将 *BoPLL* 中保守性较高的序列区段作为探针, 在甘蓝全基因组进行扫描, 查找是否有 *BoPLL* 的靶结合序列, 以此来判定该基因在染色体上的位置。进一步在该基因两侧寻找与之连锁的基因。用相同的方法依次寻找与 SI 相关的 S 位点糖蛋白 (S-locus glycoprotein, SLG)、S 位点受体激酶 (S-locus receptor kinase, SRK)、SCR/SP11 (S-locus cysteine-rich protein/S-locus protein 11)、类硫氧还蛋白 1/2 (Thioredoxin-like protein 1/2, THL1/2)、M 位点蛋白激酶 (M-locus protein kinase, MLPK)、

臂重复蛋白 1 (Arm repeat containing 1, ARC1) 和 Exo70A1 的靶结合序列, 确定它们在染色体上的位置。以此来判断 *BoPLL* 基因是否与 SI 相关的基因连锁。

## 1.6 *BoPLL* 的生物信息学分析

利用 GSDS 在线工具 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析基因组结构; 利用在线工具 ProtParam 分析 *BoPLL* 基因编码蛋白质的理化性质; 利用 Signalp 4.1 server 软件预测编码蛋白质的信号肽; 利用 TMHMM Server v.2.0 在线软件分析跨膜结构; 利用在线工具 SOPMA 软件分析蛋白质的二级结构; 运用 Netphos 2.0 server 软件预测磷酸化位点; 运用 ProtScale 在线分析软件预测疏水性/亲水性; 利用 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白质的结构域; 利用 Cell-PLoc 在线工具 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>) 预测亚细胞定位; 使用 DNAMAN Version 6.0 软件将 *BoPLL* 与甘蓝型油菜 *BnPLL* (XP 013681553.1)、白菜型油菜 *BrPLL* (XP 009133429.1)、萝卜 *RsPLL* (XP 018475341.1) 的氨基酸序列比对分析; 用 MEGA6 软件结合 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的蛋白质数据库构建 *BoPLL* 系统进化树。

## 1.7 *BoPLL* 的表达分析

通过 QRT-PCR 技术检测 *BoPLL* 在叶片、花蕾、萼片、花瓣、花粉和柱头等组织中的表达量, Samuel 等 (2009) 和 Chandna 等 (2012) 对候选内参基因的评价分析结果, 以 *Actin3* 作为内参 (表 1), 具体操作按照高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR 说明书进行。PCR 扩增参数为: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 10 s; 56 °C 5 s; 72 °C 延伸 6 s; 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存。PCR 扩增产物经  $1 \times 10^4$  mg · L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶电泳检测。

根据获得的 *BoPLL* 序列设计荧光定量 PCR 特异性引物: RT-PCR-F、RT-PCR-R (表 1), 以未授粉柱头, 自花授粉 15、30 和 60 min 和异花授粉 15、30 和 60 min 的柱头 cDNA 为模板, *Actin3* 为内参。Bio-Rad SsoFast EvaGreen Supermix 为荧光定量 PCR 染料, 反应体系为 10 μL, 在 Bio-Rad CFX-1000 荧光定量 PCR 仪上对目的基因进行荧光定量 PCR 反应。反应参数: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s; 57 °C 10 s; 72 °C 10 s; 40 个循环, 每个循环结束时采集荧光信号。40 个循环后 PCR 扩增产物进行溶解曲线分析。

反应完成后利用 Bio-Rad CFX Manager Software 和 Excel 软件进行数据分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 甘蓝 *BoPLL* 蛋白的分离与质谱鉴定

将蛋白质点 6324 肽指纹图谱与拟南芥数据库进行比对, 发现与拟南芥 *AtPLL* (LOC106333535) 匹配性最高, 相似性为 40.2%, 将该蛋白质命名为 *Brassica oleracea* Pectate Lyase Like (简称 *BoPLL*)。双向电泳结果显示 *BoPLL* 蛋白的相对分子质量约 45 kD, pI 约为 8.9。

PDQuest 软件统计 *BoPLL* 蛋白质相对表达量显示自花授粉 3 ~ 5 min 的平均值为 1 086.1, 60 min 时为 331.9; 异花授粉 3 ~ 5 min 的平均值为 430.7, 60 min 时为 1 009.1。 *BoPLL* 蛋白质在自花授粉后 60 min 的表达量相对于 3 ~ 5 min 的表达量明显减少, 而在异花授粉后 60 min 的表达量相对于 3 ~ 5 min 的表达量显著增加, 与自花授粉后的变化趋势刚好相反 (图 1)。

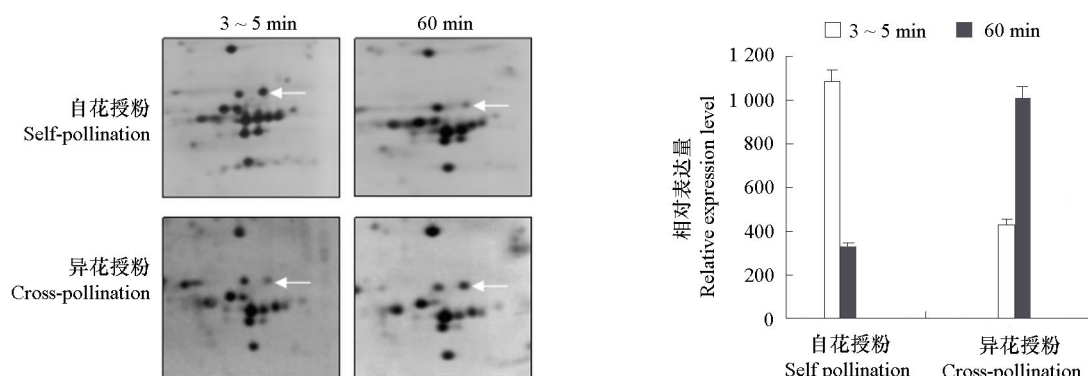


图 1 *BoPLL* 蛋白双向电泳图 (左) 和自花、异花授粉诱导甘蓝柱头 *BoPLL* 蛋白差异表达 (右)

箭头所指为 *BoPLL* 蛋白所在位置。

Fig. 1 The 2-DE electrophoresis of *BoPLL* protein (left) and differential expression of protein *BoPLL* in *Brassica oleracea* stigma after self-pollination and cross-pollination (right)

The arrows indicated the location of protein *BoPLL*.

## 2.2 *BoPLL* 的转录水平分析

根据双向电泳结果, *BoPLL* 蛋白在自花和异花授粉后变化趋势相反, 为了进一步验证 *BoPLL* 蛋白响应自交不亲和反应过程, 以甘蓝 ‘A4’ 未授粉柱头和自花和异花授粉处理的柱头为材料进行转录组测序和分析。结果显示 *BoPLL* 在自花授粉 0 ~ 30 min 持续显著上调表达, 而在 30 ~ 60 min 急剧下降; 在异花授粉 0 ~ 15 min 也是显著上调表达, 15 ~ 30 min 无明显变化, 30 ~ 60 min 继续显著上调表达 (图 2)。

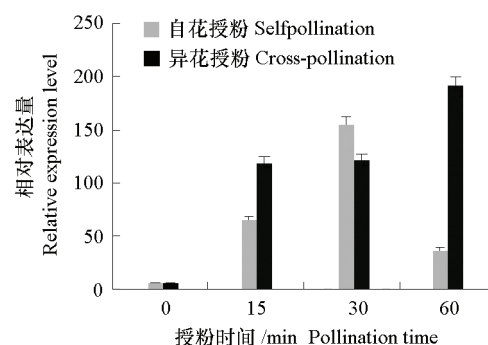


图 2 甘蓝柱头内 *BoPLL* 响应自花和异花授粉后表达模式

Fig. 2 Expression pattern of *BoPLL* in stigmas in response to self-pollination and cross-pollination

## 2.3 *BoPLL* 的克隆

对甘蓝 *BoPLL* 的克隆结果表明, *BoPLL* gDNA PCR 产物大小约 1 800 bp, cDNA PCR 产物约 1 200 bp (图 3)。

测序结果表明 PCR 扩增所获得的 *BoPLL* gDNA 序列长度为 1 796 bp, cDNA 序列长度为 1 212 bp, 包含了 *BoPLL* 完整的编码框。

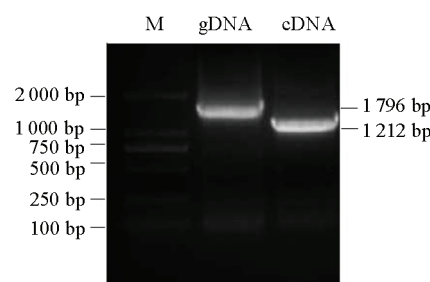


图 3 甘蓝 *BoPLL* gDNA 和 cDNA PCR 产物电泳图

Fig. 3 The agarose gel electrophoresis of gDNA and cDNA PCR product of *Brassica oleracea BoPLL*

## 2.4 *BoPLL* 的染色体定位

将 *BoPLL* 中保守性较高的序列区段作为探针, 在甘蓝全基因组进行扫描, 发现唯一的靶结合序列, 表明该基因位于 3 号染色体上, 与之紧密连锁的基因有 LOC106331600、LOC106328192、LOC106331914、LOC106335979、LOC106336284、LOC106331557、LOC106332625、LOC106336028、LOC106329208、LOC106335956、LOC106329557、LOC106332152、LOC106332233、

LOC106332234、LOC106335288、LOC106329166、LOC106328188、LOC106335790、LOC106330019、LOC106330020。

芸薹属作物与 SI 相关的基因 *SLG*、*SRK*、*SCR/SP11*、*THL1/2*、*MLPK*、*ARC1* 和 *Exo70A1* 在染色体上的位置如图 4 所示，只有 *MLPK* 与 *BoPLL* 同在 3 号染色体上，但是相距甚远，说明 *BoPLL* 不与甘蓝 SI 相关的基因紧密连锁，表明其可能是参与 SI 过程的反式作用因子。

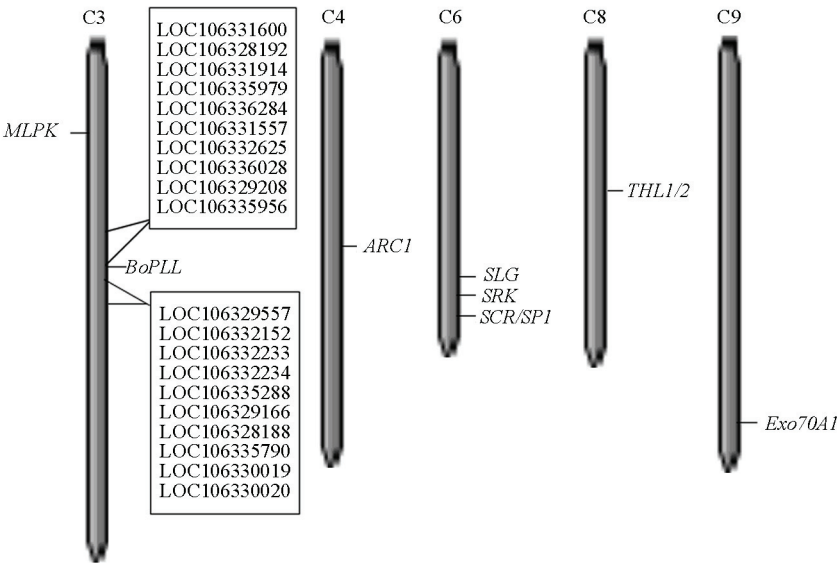


图 4 甘蓝 *BoPLL* 和 SI 相关基因在染色体上的分布

Fig. 4 Genomic distribution of *BoPLL* and SI related gene in chromosomes of *Brassica oleracea*

## 2.5 *BoPLL* 生物信息学分析

Clustal 件比对分析 *BoPLL* gDNA 和 cDNA 序列，发现该基因由 4 个外显子（分别为 147、310、519 和 232 bp）和 3 个内含子（分别为 82、232 和 95 bp）组成（图 5）。

内含子剪切位点完全遵守经典的 GT-AG 法则。*BoPLL* 的 ORF 全长 1 212 bp，编码 403 个氨基酸残基，相对分子量为 43.7 kD，理论等电点（pI）为 8.87，与柱头总蛋白质双向电泳分析中蛋白质点 6324 的相对分子质量大小和等电点基本一致，证明扩增的 *BoPLL* 就是蛋白质点 6324 的编码序列，*BoPLL* 的 Gene ID: 106333535。

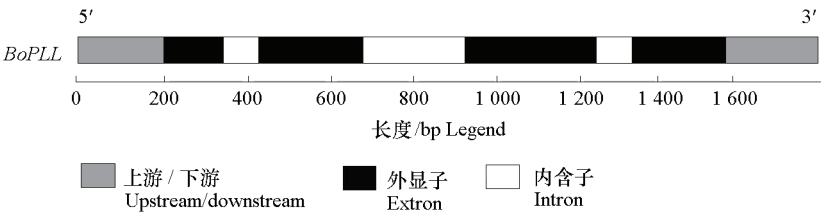


图 5 甘蓝 *BoPLL* gDNA 的结构图

Fig. 5 The gene structure of *Brassica oleracea* *BoPLL* gDNA

由图 6 可以看出, 在氨基酸组成中, Asn 和 Gly 出现频率较高, 分别占氨基酸总数的 9.93% 和 9.43%, 而氨基酸 Trp、Tyr、Met 和 Gln 分别仅占氨基酸总数的 1.0%、1.7%、1.7% 和 2.2%。带负电荷的氨基酸 (Asp + Glu) 残基有 32 个, 带正电荷的氨基酸 (Arg + Lys) 残基有 42 个。

*BoPLL* 属于疏水性蛋白质。*BoPLL* 蛋白质包含 5 个 N 糖基化位点, 9 个 N - 豆蔻酰化位点, 5 个蛋白质激酶 C 磷酸化位点, 3 个酪蛋白 II 磷酸化位点, 1 个 ATP/GTP 结合位点, 1 个多聚半乳糖醛酸酶活性位点。

```

1 M T C I A S A F K A L C L S L L F V A A V A S R P T N R P K
1 ATGACTTGCAATTGCTTCTGCGTTTAAGGCTTGTGTTGTCTCTTGTTCGTCGCGCGTTCGCAAGTCGTCGACCAACAGGCCAAAG
31 V F N V H R Y G A K A N G K I D N T K A F T N I W K S A C T
91 GTTTTAACTCCACGCTATGGTGCCAAAGCTAACGAAAAAAGTATAACCAAGCGTTCACAAACATATGAAAAAGCGCATGCACA
61 R K G G N S K I Y V P K G T F Y L G G V E F V G P C A N Q I
181 AGGAAAGGTGGTAATAGTAAATCTACGTACCGAAAGGAACGTTTATCTCGGTGGTGTAGAGTTCGTAGGGCCATGCGCGAATCAGATT
91 E F V I D G T L L A P S N P R D I K N D T W I Q F R Y I N N
271 GAATTTGTTATCGATGGAACCTTTACTGGCTCCTTCAAAACCCAGGGACATTAAGAATGACACATGGATCCAATTCAGGTACATTAACAAT
121 L I I S G A G T L D G Q G K E S W P L N D C H K N P N C P K
361 CTTATTATCTCCGTTGCCGTACACTCGACGGCCAAGGAAAGAGTCTTGGCCACTAAATGACTGCCACAAAAACCAATTCCTTAAG
151 L A M T M G F A F V N N S R I N G I T S L N S K M G H F N F
451 CTAGCTATGACCATGGGATTTGCAATTCGTGAACAACCTCAAGAATCAATGGGATAACATCACTCAACAGCAAAATGGGACACTTCAACTTC
181 F S V H H F N I T D V I V T A P G D S P N T D G L K F G F C
541 TTCCTGTCCATCACTTCAACATCACTGACGTCACTGTAAACAGCTCCCGGACAGCCCAACACCGATGGGCTAAAGTTTGGGTCTGT
211 S N I N I S R T H I G I G D D C I A I L S G T I N M D I S N
631 AGCAACATTAACATCTCCAGGACACACATTGGTACAGGAGACGACTGTATCGCCATCCTTTCCGGAACCAACATGGATATCTCTAAT
241 V N C G P G H G I S V G S L G K N K E E K D V N G L T V R D
721 GTCAACTGTGGTCCCGGACATGGGATCAGTGTGGGAAGCTTAGGGAAGAACAAGAAGAGAAGGACGTTAATGGCTTAACCGTAAAGAGAC
271 I V F N G T S D G I R I K T W E S S A S K I L V S N F V Y E
811 ATAGTCTTTAACGGCACTAGCGACGGTATTCGGATCAAGACTTGGGAGTCTTCAGCTTCGAAGATCTTGGTTTCTAACCTTTGTGTACGAG
301 N I Q M I N V G N P I N I D Q K Y C P H P P C E K K G E S H
901 AATATTAGATGATTAACGTTGAAACCTATCAACATCGACCAGAAGTATTGCTCACCACCTTGTGAAAAAGGGAGAGTCACAC
331 V Q I Q D L K L K N I Y G T S T N K V A V N L Q C S K S F P
991 GTTCAATCCAAGACCTTAATTAAGAACATATATGGAACATCGACAAACAAAGTGGCGGTGAATCTACAGTGTAGCAAGAGCTTTCG
361 C K K V E L I D I N L E H K G V E G G P S T A V C E N V D G
1081 TGCAAGAAGGTTGAGCTAATTGACATTAACTAGAGCATAAGGAGTCGAGGTTGTCCTTCCACTGCGGTATGTAGAATGTTGATGGT
391 S I R G K M V P Q H C L N *
1171 TCTACAGTGGCAAGATGGTTCTCAGCATTGCCTGAACGA
    
```

图 6 甘蓝 *BoPLL* gDNA 结构图及其推导的氨基酸序列

实线框为 N - 糖基化位点, 虚线框为 N - 豆蔻酰化位点, 椭圆为蛋白激酶 C 磷酸化位点,  
虚线椭圆为酪蛋白 II 磷酸化位点, 下划线为 ATP/GTP 结合位点,  
点线为聚半乳糖醛酸酶活性位点。

Fig. 6 The gene structure of *Brassica oleracea BoPLL* and its deduced amino acid sequence

The box was N-glycosylation site, the dashed box for N-myristoylation site, the oval for protein kinase C phosphorylation site,  
the dashed oval for casein kinase II phosphorylation site, the underline for ATP/GTP-binding site,  
the spot for polygalacturonase active site.



通过分析发现 *BoPLL* 蛋白质 N - 端有跨膜结构域和一段潜在的位号肽段, 属于疏水性蛋白, 定位于胞内近膜侧。二级结构分析发现含有  $\alpha$  - 螺旋 6.95%、无规则卷曲 53.35% 和延伸链 39.70%。*BoPLL* 具有 PLL 基因家族典型的功能域, 包含 4 个 PbH1 结构域、HYDRO 结构域、PASTA 结构域和 CMM-10 结构域。通过 GO 功能注释, PLL 基因家族蛋白主要作用是降解植物细胞壁、导致植物组织软化。在植物生殖发育过程中, PLL 基因家族蛋白与花粉壁生长相关, 主要在植物花粉发育、授粉和受精过程中起作用。通过 NCBI 网站 Blast 检索表明 *BoPLL* 与 *AtPLL* 的核苷酸序列及氨基酸序列的一致性最高, 分别为 85% 和 84% (图 7)。

利用 MEGA 软件构建 *BoPLL* 遗传进化树发现 *BoPLL* 与 *AtPLL* 亲缘关系最近, 与 *EsPLL* 亲缘关系次之, 与 *MtPLL* 亲缘关系较远 (图 8)。

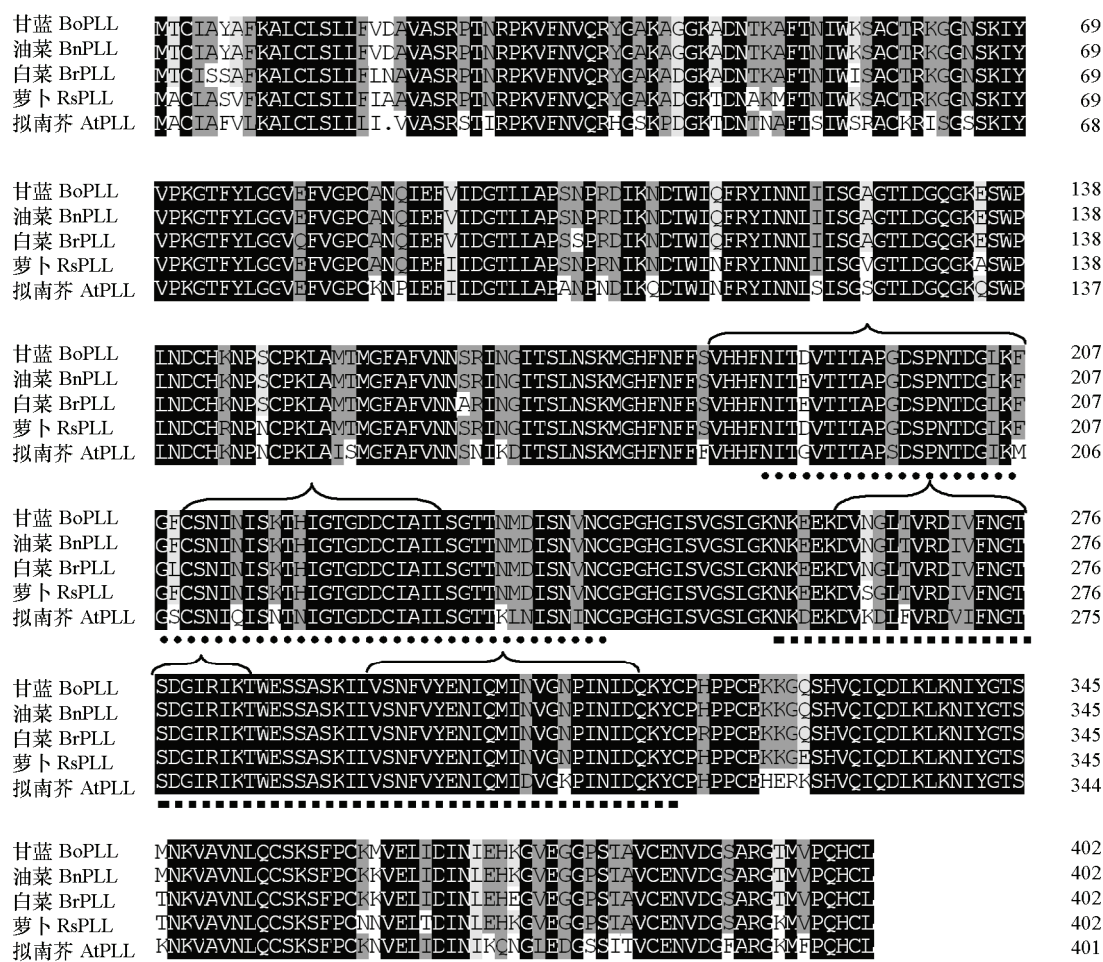


图 7 *BoPLL* 蛋白与同源蛋白序列多重比对

括弧代表 PbH1 结构域, 圆点代表 HYDRO 结构域, 方形点代表 PASTA 结构域, 实线代表 CBM-10 结构域。

Fig. 7 The multiple sequence alignment of *BoPLL* with homologous proteins

The PbH1-domain, HYDRO-domain, PASTA-domain and CBM-10-domain are marked with parentheses, dots, square point and solid line, respectively.



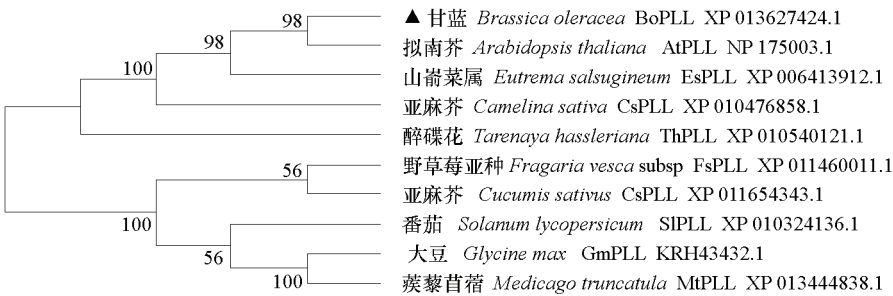


图 8 甘蓝 *BoPLL* 及其同源氨基酸序列关系分析

Fig. 8 The phylogenetic relationship of amino acid sequences between *Brassica oleracea* *BoPLL* with its homologous proteins

2.6 *BoPLL* 的表达分析

半定量 RT-PCR 分析结果（图 9）表明，*BoPLL* 主要在甘蓝花粉和柱头中表达，在柱头中的表达量明显低于花粉中表达量。而在叶片、花蕾、萼片以及花瓣中均没有检测到表达。

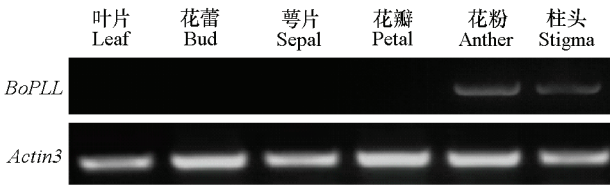


图 9 甘蓝 *BoPLL* 在不同组织中的表达检测

Fig. 9 Expression analysis of *BoPLL* in different organs of *Brassica oleracea*

另外一方面，在自花和异花授粉后不同时间的表达结果（图 10）表明，该基因在自花授粉过程中，0 ~ 15 min 下调表达，在授粉 30 min 时表达量达到最高，随后表达量一直下降；在异花授粉过程中，0 ~ 15 min *BoPLL* 也是下调表达，在授粉 15 min 时表达量达到最低，随后上调表达。即在自花和异花授粉 30 min 以后 *BoPLL* 基因表达趋势完全相反，该结果与转录组分析结果基本一致。

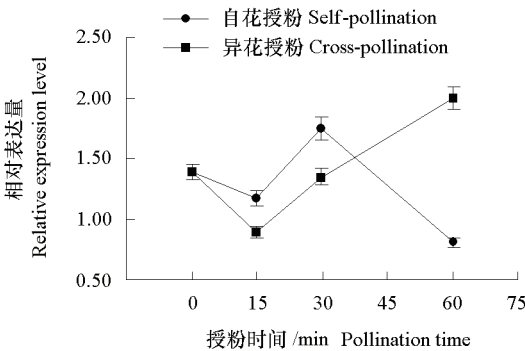


图 10 甘蓝柱头内 *BoPLL* 响应自花和异花授粉后表达模式

Fig. 10 Expression pattern of *BoPLL* in stigmas in response to self-pollination and cross-pollination of *Brassica oleracea*

### 3 讨论

甘蓝是典型的孢子体型自交不亲和植物 (Whitehouse, 1978)。花粉和柱头相互作用的过程包括花粉粘附、水合、萌发及随后花粉管穿入柱头等过程 (Hamamura et al., 2012)。在甘蓝等干型柱头上, 水合是借助于外壁流出的花粉外被物质与乳突间的足状结构进行 (Edlund et al., 2004)。在花粉管的生长过程中, 果胶质壁上沉积的胼胝质形成胼胝质栓, 使生殖细胞限制在花粉管前端 (Krichevsky et al., 2007; Zonia, 2010)。花粉管在柱头上萌发穿入柱头, 在闭合的干型柱头上, 花粉管需通过柱头的外角质层和乳突的细胞壁。花粉壁存在多种脂酶, 当清除干型柱头的表膜后, 亲和性花粉将无法进入柱头 (蒋晶晶, 2012)。由此可以得出, 花粉和柱头相互作用的这个过程中, 花粉壁起着至关重要的作用。本试验通过对甘蓝不同授粉的柱头进行蛋白质表达谱的比较研究, 获得一种差异表达的 *BoPLL* 蛋白质。进一步通过转录组数据分析发现 *BoPLL* 基因在转录水平也存在差异表达, Go 功能注释显示 *BoPLL* 属于果胶裂解酶家族, 与花粉壁生长相关。因此克隆得到的 *BoPLL* 蛋白, 其氨基酸序列分析发现其含有高度保守的 PASTA 结构域和 CMM-10 结构域, 中度保守的 PbH1 结构域, 低度保守的 HYDRO 结构域, 说明该蛋白是典型的果胶裂解酶家族蛋白。

对果胶裂解酶的相关功能研究发现, 花粉壁中的果胶裂解酶具有能够促进花粉管萌发、伸长, 降解柱头表面的角质膜, 使花粉管顺利到达胚囊的作用 (Suen & Huang, 2007)。另外, 果胶裂解酶也可能通过降解果胶物, 利用降解产物促进其持续伸长 (Wu et al., 1996)。有研究 (Rogers et al., 1992; Parre & Geitmann, 2005) 表明, 适宜浓度的外源微生物果胶酶对番茄花粉管伸长具有显著的促进作用。蒋晶晶 (2012) 报道, 抑制白菜中 *BcPLL9* 和 *BcPLL10* 基因的表达, 发现花粉内壁内层过度发育, 导致花粉管呈现波浪状结构和生长受阻, 结籽率降低。由此, 果胶裂解酶活性大小与花粉发育、授粉和受精过程相关。本文所得出的 *BoPLL* 基因在自花授粉和异花授粉后表达变化的关系进一步表明果胶裂解酶不仅参与了一般的授粉受精过程, 也可能参与了 SI 的分子过程。

Jiang 等 (2012) 对授粉后不同时间段的雌蕊用 SEM 进行观察, 得到白菜花粉的粘附和水合分别在授粉后 0.5 和 1 h。本试验通过转录组测序分析结果显示, 柱头内 *BoPLL* 基因可能在授粉 0 ~ 15 min 之间调控花粉粘附, 由于异花授粉属于亲和花粉, 所以导致 *BoPLL* 在异花授粉过程中的表达量高于自花授粉过程中的表达量。甘蓝等芸薹属作物属于典型孢子体型自交不亲和, 通常有一个干型柱头, 只有亲和花粉落到柱头后能诱导柱头释放花粉水化、萌发所需水分和其它因子, 不亲和花粉落到柱头后则在水化前或者穿过柱头前就被抑制 (Samuel et al., 2008)。在授粉后 15 ~ 30 min, 自花授粉中 *BoPLL* 表达量继续上升来抑制花粉的水合, 而在异花授粉中亲和花粉发生水合。在 30 ~ 60 min, 自花授粉由于不亲和导致花粉不能萌发, 没有观察到花粉管萌发, 以至于 *BoPLL* 表达量急剧下降; 而在异花授粉中, 花粉萌发, 花粉管穿入柱头, *BoPLL* 表达量继续上升。这些结果进一步表明, *BoPLL* 在花粉粘附、水合、萌发和花粉管伸长的过程中发挥作用, 进而参与调控甘蓝的自交不亲和过程。

Wing 等首次发现在番茄中两个与细菌果胶裂解酶相似的基因, 在成熟花药和花粉中表达量较高, 可能作用于花粉管生长过程中的果胶降解 (Wing et al., 1990)。此外, Becker 等 (2003) 在分析拟南芥花粉转录组数据时也发现 *PLLs* 在花粉中高表达。McCormick 和 Yang (2005) 在烟草花粉、花药和雌蕊中发现了多个与 *PLL* 基因序列相似的基因。拟南芥中共有 26 个 *PLL* 基因, 都在花序中表达, 其中有 14 个在花粉中高表达或特异表达 (Palusa et al., 2007), 而 *PLL9* 和 *PLL10* 的启动子

可以驱动 GUS 基因在花发育晚期的柱头表达, 调控花粉管的伸长 (Sun & van Nocker, 2010)。本研究中 *BoPLL* 基因在花粉和柱头中特异表达, 这种表达模式与其他植物中调控花粉发育、花粉管伸长的 *PLL* 基因的表达模式相似。荧光定量 PCR 结果显示, *BoPLL* 基因在自花和在异花授粉不同时间点的表达量, 其变化趋势与转录组分析结果一致。

综上所述, 推测 *BoPLL* 可能是一个参与甘蓝自交不亲和反应过程的基因, 其可能通过调控花粉管发育参与甘蓝的自交不亲和反应。这为进一步通过转基因手段验证 *BoPLL* 在自交不亲和反应中的功能提供了依据。

## References

- Becker J D, Boavida L C, Carneiro J, Haury M, Feijó J A. 2003. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiology*, 133 (2): 13 – 725.
- Chen Song, Zeng Jing, Gao Qi-guo, Zhu Li-quan, Liu Yu-dong, Ren Xue-song, Wang Xiao-jia. 2013. Differential proteomic analysis of *Brassica oleracea* stigma and pollen proteins during the early stage of compatible pollination. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (1): 69 – 78. (in Chinese)
- 陈 松, 曾 静, 高启国, 朱利泉, 刘豫东, 任雪松, 王小佳. 2013. 自交不亲和甘蓝亲和花粉授粉早期差异蛋白质分析. *园艺学报*, 40 (1): 69 – 78.
- Chandna R, Augustine R, Bisht N C. 2012. Evaluation of candidate reference genes for gene expression normalization in *Brassica juncea* using real time quantitative RT-PCR. *PLoS one*, 7 (5): e36918.
- Edlund A F, Swanson R, Preuss D. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell*, 16 (Suppl 1): S84 – S97.
- Goring D R, Glavin T L, Schafer U, Rothstein S J. 1993. An S receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1-bp deletion. *The Plant Cell Online*, 5 (5): 531 – 539.
- Hamamura Y, Nagahara S, Higashiyama T. 2012. Double fertilization on the move. *Current Opinion in Plant Biology*, 15 (1): 70 – 77.
- Jiang J, Yao L, Yu Y, Liang Y, Jiang J, Ye N, Cao J. 2014a. PECTATE LYASE-LIKE 9 from *Brassica campestris* is associated with intine formation. *Plant Science*, 229: 66 – 75.
- Jiang J, Yao L, Yu Y, Lv M, Miao Y, Cao J. 2014b. PECTATE LYASE-LIKE10 is associated with pollen wall development in *Brassica campestris*. *Journal of integrative plant biology*, 56 (11): 095 – 1105.
- Jiang J, Jiang J, Qiu L, Miao Y, Yao L, Cao J. 2012. Identification of gene expression profile during fertilization in *Brassica campestris* subsp. *chinensis*. *Genome*, 56 (1): 39 – 48.
- Jiang Jing-jing. 2012. Expression and functional characterization of genes during pollen development and fertilization in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 蒋晶晶. 2012. 白菜花粉发育和授粉受精相关基因的表达分析与功能验证 [博士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Krichevsky A, Kozlovsky S V, Tian G W, Chen M H, Zaltsman A, Citovsky V. 2007. How pollen tubes grow. *Developmental biology*, 303 (2): 405 – 420.
- McCormick S, Yang H. 2005. Is there more than one way to attract a pollen tube? *Trends in Plant Science*, 10 (6): 260 – 263.
- Nasrallah J B, Rundle S J, Nasrallah M E. 1994. Genetic evidence for the requirement of the *Brassica* S-locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response. *The Plant Journal*, 5 (3): 373 – 384.
- Palusa S G, Golovkin M, Shin S B, Richardson D N, Reddy A S. 2007. Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 174 (3): 537 – 550.
- Parre E, Geitmann A. 2005. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta*, 220 (4): 582 – 592.

- Rogers H J, Harvey A, Lonsdale D M. 1992. Isolation and characterization of a tobacco gene with homology to pectate lyase which is specifically expressed during microsporogenesis. *Plant Molecular Biology*, 20 (3): 493 - 502.
- Samuel M A, Chong Y T, Haasen K E, Aldea-Brydges M G, Stone S L, Goring D R. 2009. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *The Plant Cell*, 21(9): 2655 - 2671.
- Samuel M A, Yee D, Haasen K E, Goring D R. 2008. 'Self' pollen rejection through the intersection of two cellular pathways in the *Brassicaceae*: self-incompatibility and the compatible pollen response. *Self-incompatibility in Flowering Plants*, 173 - 191.
- Suen D F, Huang A. H. 2007. Maize pollen coat xylanase facilitates pollen tube penetration into silk during sexual reproduction. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (1): 625 - 636.
- Suen D F, Wu S S, Chang H C, Dhugga K S, Huang A H. 2003. Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen potential role in pollen tube growth on the stigma and through the style. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (44): 43672 - 43681.
- Sun L, van Nocker S. 2010. Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 10 (1): 152.
- Whitehouse H L K. 1978. Incompatibility in *Angiosperms*. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 3. Oxford: Oxford University Press: 799 - 801.
- Wing R A, Yamaguchi J, Larabell S K, Ursin V M, McCormick S. 1990. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Molecular Biology*, 14 (1): 17 - 28.
- Wu Y, Qiu X, Du S, Erickson L. 1996. PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from *alfalfa*. *Plant Molecular Biology*, 32 (6): 1037 - 1042.
- Zhu Li-quan, Zhou Yan. 2015. Protein elements and signal transduction process of self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *The Crop Journal*, 41 (1): 1 - 14. (in Chinese)
- 朱利泉, 周 燕. 2015. 甘蓝自交不亲和性信号传导元件与传导过程. *作物学报*, 41 (1): 1 - 14.
- Zonia L. 2010. Spatial and temporal integration of signalling networks regulating pollen tube growth. *Journal of Experimental Botany*, 61 (7): 1939 - 1957.
- Zou J, Song L, Zhang W, Wang Y, Ruan S, Wu W H. 2009. Comparative proteomic analysis of *Arabidopsis* mature pollen and germinated pollen. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51 (5): 438 - 455.