

谢兰曼,祝 燕,沈雪林,等. 勋章菊花粉鞘色素及蛋白分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):332-334.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.096

# 勋章菊花粉鞘色素及蛋白分析

谢兰曼<sup>1</sup>, 祝 燕<sup>2</sup>, 沈雪林<sup>3</sup>, 胡建新<sup>1</sup>

(1. 江苏联合职业技术学院苏州旅游与财经分院风景园林系, 江苏苏州 215104;

2. 苏州园林发展股份有限公司, 江苏苏州 215000; 3. 江苏省苏州市种子管理站, 江苏苏州 215000)

**摘要:**为研究勋章菊授粉形式对种子形成的影响,对其花粉鞘及蛋白成分进行分析。结果表明,黄色花粉外层含有类胡萝卜素,经板层分析得到与标准样品 $\beta$ -胡萝卜素具有相同的比移值( $R_f$ 值);经花粉表面蛋白色谱-质谱分析发现,大多为 30~50 ku;通过搜索、比对蛋白质发现,其中较可信的蛋白有 3 种,它们的肽段属于驱动蛋白马达结构域,在各自有丝分裂过程中参与染色体的运动和主轴伸长。该结果可为研究菊科植物自交及异交的亲和机制提供理论依据。

**关键词:**勋章菊;花粉鞘;蛋白质;花粉;色素

**中图分类号:** S682.1<sup>+</sup>10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0332-02

勋章菊为菊科勋章菊属植物,花形奇特,花色多彩,花心具深色眼斑,形似勋章,具浓厚的野趣,是园林中常见的盆栽和花坛、地被花卉植物,对勋章菊开展相关研究,为其在园林中应用开辟更广阔的前景。

植物开花后,须要经过花粉萌发、花粉管进入胚囊和配子融合等一系列过程才能完成受精作用<sup>[1]</sup>。其中,最为关键性的一步就是花粉在柱头上的识别,对完成受精起着决定性作用。马纪峰等研究表明,柱头通过分泌某些物质主动地参与花粉与柱头的识别过程<sup>[2]</sup>,而花粉粒的初始识别是由花粉鞘调节的,花粉鞘是由花药绒毡层分泌并沉积于花粉表面的中性脂类、碳水化合物、蛋白质和类胡萝卜素等组成的半固态覆盖层<sup>[3-4]</sup>。花粉粒和雌蕊柱头组织间产生的蛋白质则是识别作用的主要物质<sup>[5]</sup>。勋章菊的管状花之间的传花授粉有别于其他菊科植物,花粉表面的一些小分子组成的胞外层物质参与了花粉的水合反应。为了探明授粉形式(自花和异花)对种子形成的影响,本研究对勋章菊花粉鞘及其成分进行了分析,以期研究菊科植物自交及异交的亲和机制提供理论依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

以红纹品种为材料,选取盆栽开花植株进行试验。

### 1.2 方法

**1.2.1 花粉表面色素层析** 取开放的红纹头状花序,小心摘取管状花 8~10 朵,用蒸馏水观察花粉鞘的剥离;用 80% 丙酮溶液将柱头上的花粉洗下,4 000 r/min 离心后上清液即为花粉的色素提取液。取色素提取液 10  $\mu$ L 点样于 10 cm  $\times$  10 cm 的硅胶板上,以 $\beta$ -胡萝卜素为对照,在石油醚:丙酮=

65:35 的展开剂中展开 15 min,取出硅胶板置室内晾干,在 WD-9403 型紫外仪下进行观察<sup>[4]</sup>。

**1.2.2 花粉表面蛋白 SDS-PAGE** 取 0.5 mL 离心管加入 60  $\mu$ L 提取缓冲液,取红纹头状花序,小心摘取 8~10 朵刚刚开放、柱头呈蜡烛状的管状花,放入离心管中,浸提 2 h;取 8~10 朵柱头呈牛角状的管状花,观察是否附着花粉,选择无花粉附着的柱头置离心管中浸提 2 h,摇匀后沸水浴 10 min,静置,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。电泳选择浓缩胶 5%、分离胶 8%、1.5 mm 厚胶板<sup>[6]</sup>。

SDS-PAGE 采用 DYY-10 型电泳仪,1.5 mm 胶板,提前配制 8% 分离胶及 5% 浓缩胶,制好后取蛋白上清液上样 40  $\mu$ L,室温电泳至溴酚蓝指示带距凝胶底边 3~5 mm 时停止。将凝胶放入染色液中染色 1 h,置于脱色液(5% 甲醇,7.5% 冰醋酸)中脱至蛋白谱带清晰、背景颜色干净,用相机拍摄凝胶电泳图像<sup>[7]</sup>。

**1.2.3 花粉表面蛋白质谱分析** 将凝胶上目的蛋白条带切胶回收,放入 1.5 mL 离心管中,冷冻密封保存,采用 Thermo Finnigan 公司的离子阱液质联用仪(LCQ Deca XP plus)对样品进行 LC-MS/MS 分析<sup>[8]</sup>。胶的酶解和质谱分析委托上海中科新生命生物科技有限公司完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 花粉表面色素定性分析

在勋章菊开花中期和后期,会出现黄色和白色 2 种花粉,在显微镜下观察,黄色花粉表面附着 1 层黄色油性覆盖物,即花粉鞘,花粉鞘在水体中会快速释放,并作短暂的布朗运动(图 1-a)。花粉鞘经过 80% 丙酮提取后,与标准样品( $\beta$ -胡萝卜素)同时薄板层析,结果表明,花粉中所含的色素与 $\beta$ -胡萝卜素具有相同的比移值( $R_f$ , 6.0/6.0=1)<sup>[9]</sup>。初步确定勋章菊花粉色素为 $\beta$ -胡萝卜素(图 1-b、图 1-c)。而白色花粉的花粉鞘中不含类胡萝卜素。

### 2.2 花粉表面蛋白 SDS-PAGE

取红纹花粉、柱头提取液进行 SDS-PAGE,结果(图 2)

收稿日期:2015-07-24

基金项目:江苏省苏州市科技支撑计划(农业)(编号:SNG201409)。

作者简介:谢兰曼(1972—),女,山东济宁人,硕士,副教授,主要研究方向为园林植物。E-mail:xielanman519@163.com。

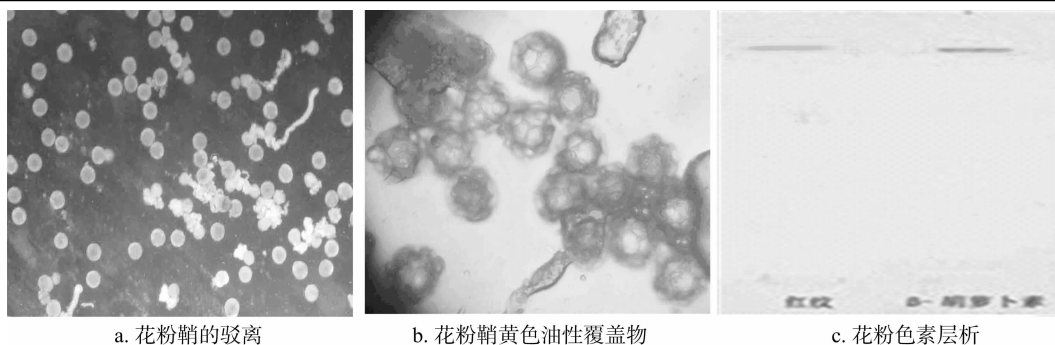


图1 勋章菊红纹花粉色素分析

表明,无论是蒸馏水提取还是样品缓冲液提取,对花粉和柱头表面蛋白的 SDS-PAGE 结果影响不大。花粉表面蛋白大多为 30~50 ku,在此区间内条带较粗,蛋白含量高;而柱头由于蛋白提取技术及蛋白含量低的原因,未能获得有效条带。

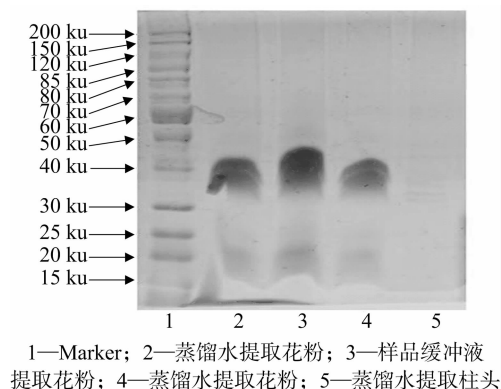


图2 红纹花粉、柱头 SDS-PAGE 结果

### 2.3 花粉表面蛋白质谱分析

用 8% 分离胶对花粉表面蛋白进行 SDS-PAGE,切下的胶经酶解成肽段混合物后,进行色谱-质谱联用的 LC-ESI MS/MS 分析<sup>[10]</sup>,得出的一级质谱图,利用 MS 分析数据,通过 BOWWORKS 软件搜索 NCBI 全蛋白库,比对 22 种蛋白,其中比较可信的蛋白有 6 种,鉴定成功的有 3 种。3 种蛋白的等电点范围为 5.84~8.16,蛋白分子量范围为 817 24.2~102 996.9 u。比对了毛杨果(*Populus trichocarpa*)、小球藻、栓皮栎(*Chlorella variabilis*)、水稻(*Oryza sativa Japonica Group*)、绿藻(*Ostreococcus tauri*)等肽段序列,发现与毛杨果的一个肽段序列及葡萄(*Vitis vinifera*)的 2 个肽段序列同源性非常高。与毛杨果同源的肽段属于驱动蛋白马达结构域, CENP-E/KIP2-like 组分,它们在有丝分裂过程中参与染色体的运动和主轴伸长,在细胞内的运输和细胞分裂中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。

## 3 结论与讨论

### 3.1 勋章菊花粉表面色素分析

花粉表面覆盖物(花粉鞘)的成分较为丰富,其主要成分为孢粉素、纤维素、类胡萝卜素、类黄酮素、脂类、糖类及蛋白质等,这一特征不仅贮藏着受精过程的信息物质,而且在花粉生态学中具有重要意义<sup>[12]</sup>,其中色素在植物受精生理过程中充当着重要保护者的角色,它能有效地阻截紫外线对花粉生命力的损伤,胡萝卜素在花粉表面的富集,使紫外线对花粉的伤

害降到最低<sup>[13]</sup>。勋章菊的花粉大多是黄色的,当花粉成熟时,花粉粒撒在聚药雄蕊的“筒”中,待雌蕊花柱伸长时,成熟花粉粒粘在柱头的外表面被“推”出筒外。但“推”出后的第 2 天,花粉即由黄色变为白色,这是由于花粉表面的  $\beta$ -胡萝卜素经太阳光照射后降解所引起的<sup>[13]</sup>。但白色花粉与黄色花粉在萌发、受精方面是否存在差异还需要进一步研究阐明。

### 3.2 花粉表面蛋白 SDS-PAGE

研究表明,孢子体自交不亲和系统的花粉与柱头的识别机制是由 S 等位基因编码的 S 蛋白质决定的,本试验通过对勋章菊花粉、柱头的表面蛋白质 SDS-PAGE 分析,以探讨表面蛋白对于受精生理的影响。对于勋章菊花粉和柱头表面蛋白的提取,蒸馏水和样品缓冲液的效果相似,没有明显区别。由于试验材料的特殊性(花粉粒、柱头体积小,样品取样难度大,柱头切口易流出组织液影响样品提取等),导致凝胶电泳未能分离出更多的清晰条带。

### 3.3 花粉表面蛋白质谱分析

花粉表面蛋白除了参与黏附作用之外,还参与花粉的水合作用。大部分植物的花粉粒在丛花药中释放之后都是高度失水的,代谢活动处于很低的状态。花粉表面蛋白还参与了花粉与柱头的信号识别过程,直接影响花粉的萌发<sup>[14]</sup>。本试验对勋章菊花粉表面蛋白的质谱分析表明,与葡萄同源的肽段在序列长为 35 个氨基酸的位置,通常发现在 4 个或更多的串联拷贝,这些具有一定代表性的植物蛋白对叶绿体或线粒体的排序具有重要影响。

## 参考文献:

- [1]潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,1958:257.
- [2]Ma J F, Wang X L. Ultrastructures of pollen and papillar cell of *Ara-bidopsis* during pollination[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(8): 892-896.
- [3]谢 姣,王 华,任廷远,等. 松花粉的功效及应用展望[J]. 食品与药品, 2011, 13(2): 139-141.
- [4]Elleman C J, Franklin-Tong V E, Dickinson H G. Pollination in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes[J]. New Phytologist, 1992, 121(3): 413-424.
- [5]郑湘如,王 丽. 植物学[M]. 北京:中国农业出版社,2007: 180.
- [6]王文莉,赵兰勇,丰 震,等. 平阴玫瑰花粉亚显微形态及品种分类研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 527-530.
- [7]张承毅,吴承来,张春庆. 蛋白质电泳法鉴定大白菜种子纯度[J].

王会刚,高艳红,张向红. 基于 ANSYS 的轮式拖拉机后桥壳数值分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):334-336.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.097

# 基于 ANSYS 的轮式拖拉机后桥壳数值分析

王会刚,高艳红,张向红

(唐山学院,河北唐山 063000)

**摘要:**基于 ANSYS 软件,运用有限单元法对农用拖拉机后桥壳进行了静力分析,校核了车桥的强度和刚度,指出了后桥壳受力的关键部位和薄弱环节;对后桥壳进行了模态分析,得出了前几阶固有频率和振型。基于分析结果提出了后桥设计时应注意的问题和改进方向。

**关键词:**拖拉机;后桥壳;有限元法;静力分析;模态分析

**中图分类号:** S219.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0334-03

驱动桥壳是轮式拖拉机<sup>[1]</sup>上的主要承载构件之一,其作用主要是支撑并保护主减速器、差速器和半轴等。主要有整体式桥壳、可分式桥壳和组合式桥壳3类。本研究以整体式桥壳为例,基于 ANSYS 软件,对其做了静力分析和模态分析,校核了桥壳的强度和刚度,为后桥设计、改进提供了理论依据,具有一定的理论意义和重要的实用价值。

## 1 实体模型

考虑到后桥形状复杂,建模软件选用 Pro/E,采用特征建模,分析时用 IGES 格式导入 ANSYS。后桥由半轴套管、壳体、加强环、镶块等组成,由于钢板弹簧座对桥壳有较大影响,将钢板弹簧座也作为实体模型的一部分。实体模型建立后,经过编辑、修改后生成有限元模型<sup>[2-4]</sup>,实体造型如图1所示。

## 2 有限元模型

单元的选择:根据有限元理论,用三维实体单元描述后桥结构更能反映后桥的实际状况。由于六面体单元在划分时要求结构较规则,而四面体单元比较灵活,因此,采用四面体单

元,选用具有较高刚度及计算精度的四面体10节点92号单元自由划分网格,在 ANSYS 环境运行,对桥壳一次性自动划分网格。共有24 600个节点,19 700个单元,网格划分结果如图2所示。

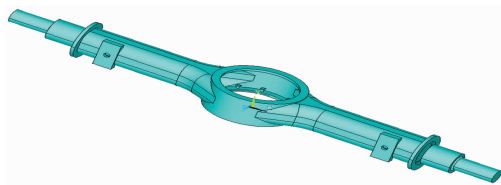


图1 后桥壳有限元模型

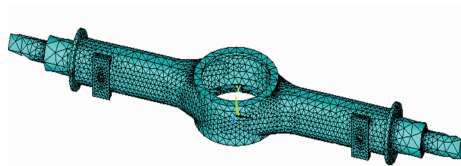


图2 后桥壳的网格划分

材料模型:壳体材料为 09SiVL-8,弹性模量为  $2.06 \times 10^5$  MPa,泊松比为 0.3,密度为  $7\ 850\ \text{kg/m}^3$ ,材料的屈服强度为  $510 \sim 610\ \text{MPa}$ <sup>[5]</sup>。

## 3 静力分析

静载荷是指作用在车桥上的所有质量引起的载荷,包括:固定在车桥上的总质量和乘员、货物的质量,集中或分布作用在车桥相应位置。

桥壳垂直弯曲刚度和强度的计算是先将后桥2端固定,

收稿日期:2015-07-18

基金项目:2014年河北省高等学校科学技术研究重点项目(编号:ZD2014206)。

作者简介:王会刚(1968—),男,河北滦南人,博士,教授,主要从事 CAD/CAE/CAM 研究。E-mail:chaochao1994@sina.com。

通信作者:高艳红,硕士,讲师,主要从事 CAD/CAE/CAM 研究。E-mail:yhgaoer@163.com。

山东省农业管理干部学院学报,2007,23(1):166.

[8]董 耿,韦顺恋. 大白菜花粉壁蛋白和柱头表膜蛋白与自交不亲和的关系[J]. 园艺学报,1993,20(4):363-368.

[9]Edlund A F, Swanson R, Preuss D. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination[J]. The Plant Cell, 2004, 16(Suppl1):S84-S97.

[10]Elleman C J, Dickinson H G. Pollen-stigma interactions in *Brassica*. IV. Structural reorganization in the pollen grains during hydration[J]. Journal of Cell Science, 1986, 80(1):141-157.

[11]刘晓红,彭丽媛,龚树青,等. 牵牛花粉表面物质的释放[J]. 北方园艺,2006(5):124-125.

[12]陆小平,王杰青,宋中梅,等. 裂叶牵牛花色变异株后代的表型分析[J]. 分子植物育种,2005,3(1):71-74.

[13]张 丞,王 冠,易素华,等. 拟南芥花粉表面蛋白质数据的整合[J]. 上海师范大学学报:自然科学版,2009,38(5):511-515.

[14]王孝鹏,孙晓梅. 三色堇花粉生活力最佳测定方法的筛选[J]. 安徽农业科学,2008,36(7):2756,2769.