

无花瓣油菜雄蕊心皮化突变体细胞学观察及基因表达分析

王道杰*, 杨翠玲, 刘展, 董龙

河南大学生命科学学院, 棉花生物学国家重点实验室, 河南开封475004

摘要: 油菜是我国重要的油料作物, 油菜花器官具有典型的十字花科特点, 无花瓣油菜在花期不存在花冠层, 这种特点有助于提高油菜产量, 预防菌核病的传播。雄蕊心皮化是指花器官的雄蕊结构被具有类似于雌蕊结构的器官代替, 这不仅造成了花器官结构的变化也导致了雄性不育。本文通过对无花瓣油菜雄蕊心皮化突变不育分离群体中的雄性可育株和不育株的比较研究, 发现心皮化现象是由遗传因素引起的。细胞学观察发现, 雄蕊心皮化在花器官发育的早期就已经产生, 心皮化的雄蕊中着生类似于胚珠的结构, 其顶端细胞的形态和排列方式也与雌蕊柱头相似。花发育相关基因的表达分析表明, B组基因*AP3*在不育株3轮花器中的表达都比可育株低, 特别是在第二轮花器官中这种差异最为突出。而A组基因*AP1*在不育株第二轮花器官中的表达量较可育株高。C组基因*AGL8*、*SHP1*、*SHP2*、*NAP*在不育株心皮化的第二轮花器官中表达都较可育株中高。

关键词: 无花瓣; 花发育; 雄蕊心皮化; 细胞学; 基因表达; 油菜

Cytological Characterization and Gene Expression of Carpelloid Stamen of Apetalous Flower in *Brassica napus* L.

WANG Dao-Jie*, YANG Cui-Ling, LIU Zhan, DONG Long

College of Life Science, National Key Laboratory of Cotton Biology, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

Abstract: Rape is an important oil crop, its flower organ has typical characteristics cruciferous flower. There is no flower canopy in apetalous rape, this can result in increasing production and preventing disease infection. The carpellogy of stamens refers to the stamens structure of the flower transformed to carpel, this not only causes the alteration of the flower structure, but also leads to the male sterility. In this study, we compared apetalous flower with carpelloid stamens (AS) with apetalous fertile flower (AF). The results showed that carpellogy of stamen was controlled by genetic factors and was initiated in the early stage of flower bud development. There were some ovule-like organs in the carpelloid stamens of AS, and the forms and arrangement of apical cells of AS carpelloid stamens were similar to the pistil of AF. Expression of several genes related to flower development were detected. The results show that expression of *AP3* of class B in all floral organs of AS were lower than those of AF, particularly in stamens. Correspondingly the expression of *AP1* of class A and *SHP1*, *SHP2*, *NAP*, *AGL8* of class C in the carpelloid stamens of AS was higher than that in AF stamens.

Key words: apetalous; flower development; carpelloid stamen; cytological characterization; gene expression; *Brassica napus* L.

花器官是植物的重要繁殖器官, 不同花器官突变体是研究花发育机制的理想材料。同时, 有些花器官缺失突变体在生产上具有重要的应用价值。例如, 油菜花第二轮花器官变异形成的无花瓣油菜光合效率相对较高, 一定程度上具有增产的潜力 (Rao等1991; Fray等1996)。无花瓣油菜在抵抗病虫害方面也有一定的作用。油菜的花瓣是传播病害的重要媒介(如菌核病等), 油菜花瓣不仅是病原菌的初次侵染源, 而且为病原菌的生长繁殖提供了寄存地和能量。另外随着干枯花瓣随风

飘落到油菜的其他叶面上, 形成了对植株的二次传染, 进一步加重了病情并使病害迅速蔓延(傅寿仲等1996)。

雄蕊心皮化是指花器官的雄蕊结构突变成类似于雌蕊结构的器官, 这不仅造成了花器官结构的变化也导致了雄蕊的不育。雄性不育是杂种优

收稿 2013-12-09 修定 2014-01-10

资助 国家自然科学基金(31201148和31271763)和河南省科技计划项目(132102110111)。

* 通讯作者(E-mail: wangdj@henu.edu.cn; Tel: 0371-23881387)。

势大规模利用的基础,在玉米、水稻、油菜等作物中得到广泛应用。人们在生产中利用可遗传的雄性不育系大量生产杂交种子,从而提高农作物的产量,改善品质,增强植株抗性和提高植株适应性。

油菜和拟南芥属于典型的十字花科植物,四轮花器官以同心圆依次着生,由外向内依次是最外面第一轮的花萼、第二轮的花瓣、第三轮的雄蕊和最内层第四轮的雌蕊。拟南芥中的研究表明,四轮花器官受ABC 3组功能基因协同调控,同时有SEP基因参与这种调控过程。“ABC”模型中B组基因APETALA3 (AP3)和PISTIALLATA (PI)编码MADS-Box转录因子,以异二聚体形式结合,调控花瓣、雄蕊的发育,任一基因功能缺失都会产生花瓣萼片化、雄蕊心皮化突变(Jack等1992; Goto和Meyerowitz 1994)。雄蕊心皮化突变使得雄蕊完全丧失,由此产生的雄性不育稳定、彻底,是一种新的雄性不育类型。我们在甘蓝型无花瓣油菜品系后代中发现了一种雄蕊心皮化的突变不育株。将该不育株与系内可育株连续兄妹交,后代群体育性一直处于1:1分离状态。分离系中不育株与可育株均无花瓣,不育株的雄蕊变为类似于心皮的结构,内生类似胚珠的组织,无花粉。该不育性状不受环境影响,不育性彻底稳定。这种无花瓣突变不育系既具有无花瓣油菜高光效、抗病虫的优点,又具有不育性稳定彻底的特点,在油菜杂种优势利用中具有广阔的应用前景。但目前对于引起

该类型不育系雄蕊心皮化的机制还不清楚。本文对无花瓣油菜雄性不育突变分离系中的雄性不育株和可育株从形态学、细胞学和基因表达等不同水平进行比较研究,为进一步阐明无花瓣油菜雄蕊心皮化机理及其应用途径奠定基础。

材料与方法

1 实验材料

1.1 植物材料

植物材料为本课题组培育的甘蓝型无花瓣油菜(*Brassica napus* L.)雄性不育1:1分离系。每年9月下旬将试验材料播种于河南大学植物逆境生物学重点实验室试验田,按常规育种试验田进行管理,在盛花期将不育株(ape-talous sterile, AS)与可育株(apetalous fertile, AF)兄妹交进行繁种保存,并适时取样观察或保存备用。

1.2 引物

引物设计使用Primer Premier 5.0软件,然后交由invitrogen公司合成(表1)。

2 实验方法

2.1 花器官形态特征及细胞学观察

在油菜初花期能辨别育性时,分别取不育株和可育株花蕾及完全开放的花朵,对比观察二者花器外观形态、花丝长度、雄蕊形态及颜色、雌蕊发育状况等,并用数码相机拍照记录。

采用石蜡切片、甲苯胺蓝染色法对不育株和

表1 实验中用到的引物

Table 1 Primers in the experiment

| 用途 | 基因 | 正向序列(5'→3') | 反向序列(5'→3') |
|-------------|--------------|-------------------------|--------------------------|
| 半定量RT-PCR | <i>ACTIN</i> | GGACAAGCCCGAGCCGACA | CGCCACAACCTACCACCCTCA |
| | <i>API</i> | TGAATTCGCGGAGGGAGTGGT | TTGTCAGCCTACAAGCCCGAAC |
| | <i>AP3</i> | TGCCTAAAGGGCGGAGGGAGT | TTGTCAGCTACTTCAAGCCCGAAC |
| | <i>AGL8</i> | ACCATAACCTCAGCACGCCAA | AAAGGAGAATGAACGGAAGAGG |
| | <i>NAP2</i> | TTTCTTCAGCCCGAGGCCGAAA | AAACGAGAGCTTCTTGACGCCT |
| | <i>SHP1</i> | TGCGTTTACGCGTTTTGTAATGG | CCGACGATCAACTGAACCTGACCG |
| | <i>SHP2</i> | AAATGGAGGGTGGTGCAGTGA | AACCTCAGCGTCACACAAACAGA |
| | qRT-PCR | <i>18S-rRNA</i> | GTGCAGCATGGATAATCAGG |
| <i>API</i> | | TATCCGCTCTTACGGTTCCC | TACCAAGACAGCCGCAITTTCT |
| <i>AP3</i> | | ATTAACCGTCCACCCAGTAA | CCTAAACAGTTTAAGGCTCGTAT |
| <i>AGL8</i> | | CTTCTTTGCATAAAAAGAATG | AACTCAGCAATTAAGATGGCTC |
| <i>NAP2</i> | | TTTCAGCCCGAGAGCCGAAA | GACGAGAGCTTCTTGACGCCT |
| <i>SHP1</i> | | ATAGAAGCCCACCCTCCCTA | CTTAACGGGGCTTGAGGCAGA |
| <i>SHP2</i> | | ATAGAGGGTGGTGCAGTGA | AACCTCGCGTCACACAAGACAGA |

可育株花器官细胞形态结构进行观察分析。

2.2 基因表达分析

油菜盛花期, 取未开放的花蕾, 于冰上快速分离花萼、雄蕊和雌蕊, 放入液氮速冻后保存备用。用Trizol (Invitrogen)法提取各组织总RNA, 参照Frist-Strand Synthesis of cDNA试剂盒(Promega)说明书合成cDNA, 以此为模板进行RT-PCR或qRT-PCR分析。

PCR反应: 以合成的cDNA为模板, 用基因特异性引物对各样品进行PCR扩增。为了保证各样品的上样量一致, 以油菜*ACTIN*基因作内参标定上样量。

qPCR反应在Mx3005P Real Time PCR 扩增仪上进行。荧光定量PCR试剂盒为TaKaRa SYBR ExScript RT-PCR Kit (Code No. DRR041A), 按照试剂盒说明采用两步法PCR反应进行。反应结束后根据扩增曲线和融解曲线分析qPCR效率, 制作标准曲线, 定量分析各基因的相对表达量。每样品取样3次, 每次设3个重复。

结果与讨论

1 甘蓝型无花瓣油菜突变不育株(apetalous sterile, AS)与等位可育株(apetalous fertile, AF)花器官形态特征比较

我们在甘蓝型无花瓣油菜品系后代中发现1

种突变不育株。将该不育株与系内可育株连续兄妹交, 后代群体育性一直处于分离状态。分离群体中不育株(AS)与可育株(AF)均无花瓣。通过田间比较观察发现, 除花器官外, 可育株与不育株在长势和整体形态上无明显的差异(图1-A)。不育株和可育株在花蕾颜色和形态上有明显差异。AF的花蕾表面光滑圆润, 用手压捏感觉饱满且花蕾呈现浅黄色。而AS的花蕾表面稍有皱褶, 花蕾颜色呈现绿色。开花后两者的形态特征差异更为明显(图1-B)。AS与AF的花蕾大小基本一致, 剥去花蕾的外层萼片发现二者均有未完全退化掉的花瓣残痕。去掉萼片观察发现, 与可育花相比, 不育花雄蕊严重变异, 6枚雄蕊颜色深绿, 呈槽状卷曲并围绕雌蕊紧密抱合在一起。拨开抱合的雄蕊发现其内着生有类似胚珠状的绿色小珠(图1-C), 这种结构与心皮极为相似, 故称为心皮化雄蕊。由于心皮化雄蕊相互间在开花之前的过度粘连抱合, 导致不育株雌蕊无法顺利伸展而中部略有弯曲, 但是随着开花的进行, 心皮化的雄蕊展开, 大多数情况下与雌蕊分离, 使得AS的雌蕊形态逐渐趋于正常, 只有少部分AS的柱头有一定的弯曲(图1-D), 但授粉后可以完成受精过程而正常结实, 表明不育花中的雌蕊是正常可育的。

AS的6枚原本是雄蕊的器官与可育株雄蕊在形

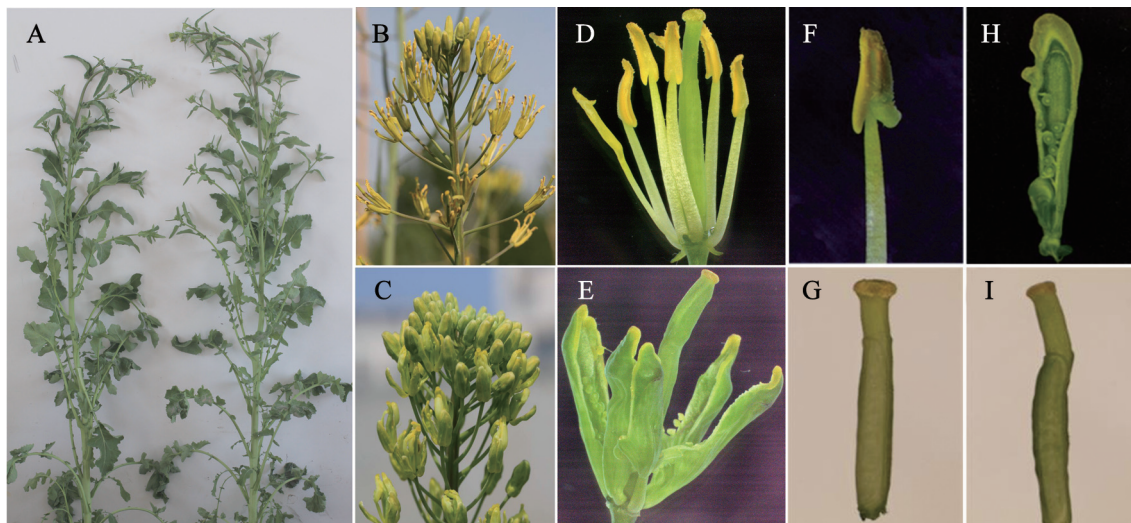


图1 可育株(AS)与不育株(AF)形态比较

Fig.1 Comparison on the morphology of apetalous fertile (AF) and apetalous sterile (AS)

A: 植株形态(左为可育株, 右为不育株); B: 可育株主花序; C: 不育株主花序; D: 可育花(去除花萼); E: 不育花(去除花萼); F: 可育花雄蕊; G: 不育花雌蕊; H: 不育花心皮化雄蕊; I: 不育花雌蕊。

态上完全不同。AS的6枚原本是雄蕊的器官呈现不规则的内凹的槽状(图1-C)。AS雄蕊的顶部呈现三角形状, 并且边沿颜色偏黄, 与雌蕊的柱头结构比较相似, 基部以绿色的小柄与花托连接。6枚凹陷的槽状雄蕊内部着生数目不等的、类似于胚珠的绿色圆球状组织(图1-C)。授粉后随着角果的发育, 心皮化雄蕊中的绿色类胚珠组织发育停止并死亡, 而绿色类心皮组织依然存在一段时间后才干枯脱落。

2 甘蓝型无花瓣油菜突变不育株雄蕊心皮化结构细胞学观察

通过解剖甘蓝型无花瓣油菜突变不育株的花蕾, 以及可育株和不育株花蕾石蜡切片观察, 发现可育株的雄蕊与不育株的雄蕊细胞结构完全不

同。AF的雄蕊组织具有完整的四分体结构, 其内有大量的花粉粒, 而AS的雄蕊细胞结构明显趋于心皮化, 具有类似雌蕊器官的细胞学特征, 其内还着生少量的类胚珠组织(图2-N、S)。

选取可育株和不育株不同发育阶段的花蕾(以花蕾直径进行分段取样)分别做横切片和纵切片观察。结果显示, 二者花蕾的各个阶段都存在差异, 不育株本该是雄蕊的部位突变成明显的心皮化组织而缺失雄蕊(图2-F~J、P~T), 导致雄性不育, 可育株雄蕊发育正常(图2-A~E、K~O)。

正常可育株雌蕊顶端柱头组织的细胞形状排列不规则也比较松散(图3-A), 不育株雌蕊顶端柱头组织的细胞形状排列与AF相同(图3-B), 而其心

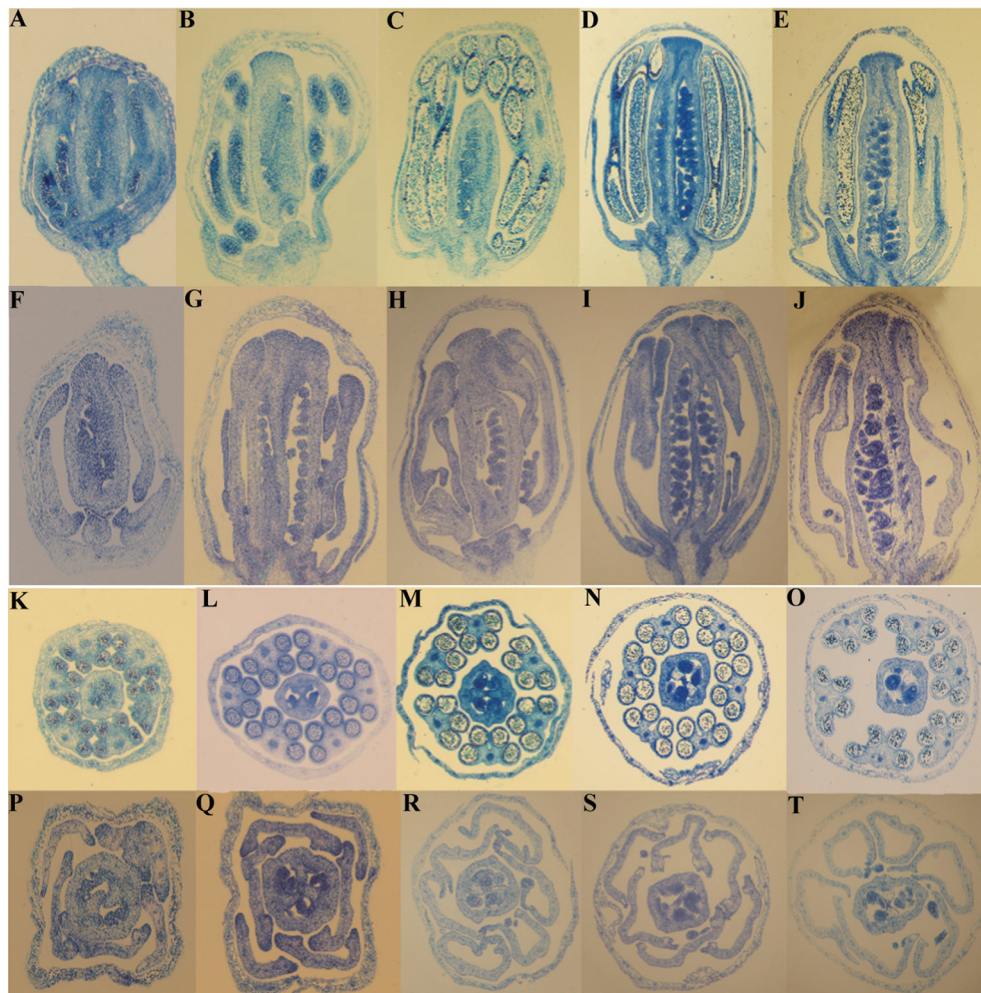


图2 不同发育阶段花器官结构比较

Fig.2 Comparison on the structure of floral organ at different development stages

A~E: 无花瓣可育花蕾纵切片(AF); F~J: 无花瓣雄蕊心皮化花蕾纵切片(AS); K~O: 无花瓣可育花蕾横切片(AF); P~T: 无花瓣雄蕊心皮化花蕾横切片(AS); A, F, K, P: 减数分裂时期; B, G, L, Q: 四分体时期; C, H, M, R: 单核高峰期; D, I, N, S: 双核高峰期; E, J, O, T: 花粉发育的成熟期。

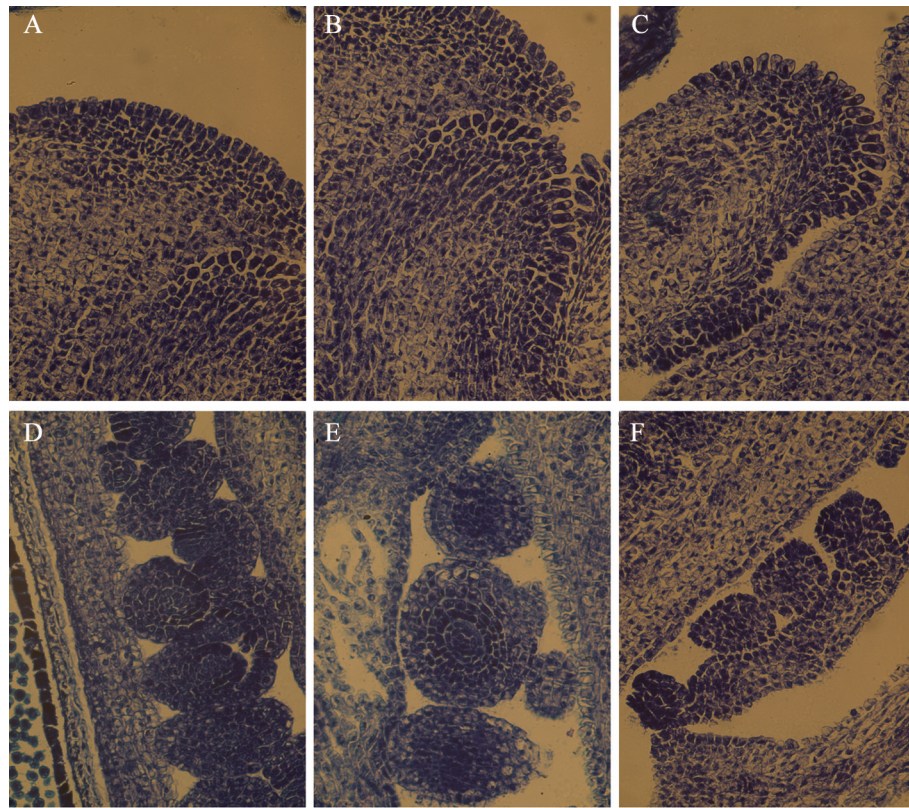


图3 AS心皮化雄蕊组织与AF心皮组织比较

Fig.3 Comparison on the carpelloid stamen of AS and carpel of AF

A: AS柱头; B和C: AS心皮化雄蕊顶端; D: AF胚珠; E: AS胚珠; F: AS心皮化雄蕊中着生的类胚珠。

皮化的雄蕊顶端组织细胞在形态和排列上与雌蕊相似(图3-C), 从而在细胞学结构上进一步表明不育株的雄蕊发生心皮化突变。比较正常胚珠及心皮化雄蕊内着生的类胚珠发现, 不育株的胚珠形态(图3-E)和可育株的胚珠形态(图3-D)大致相同, 并且它们组成胚珠的细胞排列方式也相似。但是不育株的心皮化雄蕊虽具有类胚珠结构, 但这种类胚珠结构比正常胚珠小, 细胞排列也没有正常胚珠细胞排列规则(图3-F)。

3 花器官发育相关基因的表达分析

从上述形态及细胞学分析中可知, AS和AF的主要差别是AS花器官的雄蕊发生心皮化变异。为了从基因表达水平上检测二者的差别, 分别提取AS和AF第三轮花器官总RNA, 对影响花器官发育的A、B、C组功能基因及SEP家族基因进行半定量RT-PCR检测。结果显示, 在第三轮花器官中, *API*、*AP3*、*AGL8*、*SHP1*、*SHP2*、*NAP*基因的表达量在AF与AS之间存在一定的差异(图4)。

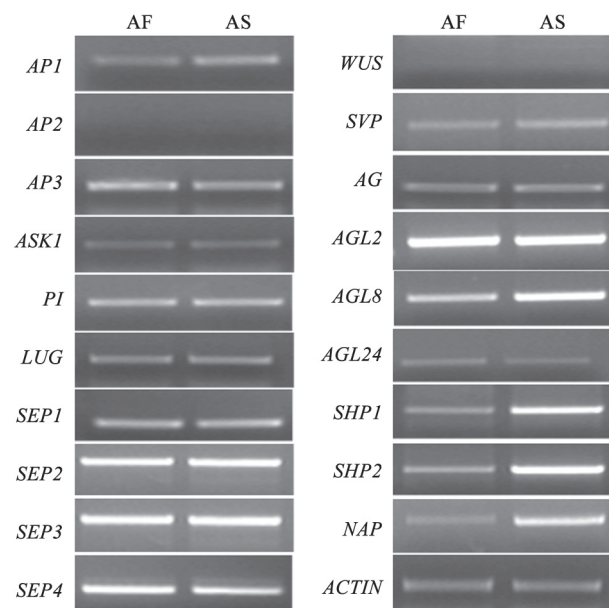


图4 花发育相关基因的RT-PCR分析

Fig.4 RT-PCR analysis of genes related to flower development

AF: 正常雄蕊; AS: 心皮化雄蕊。

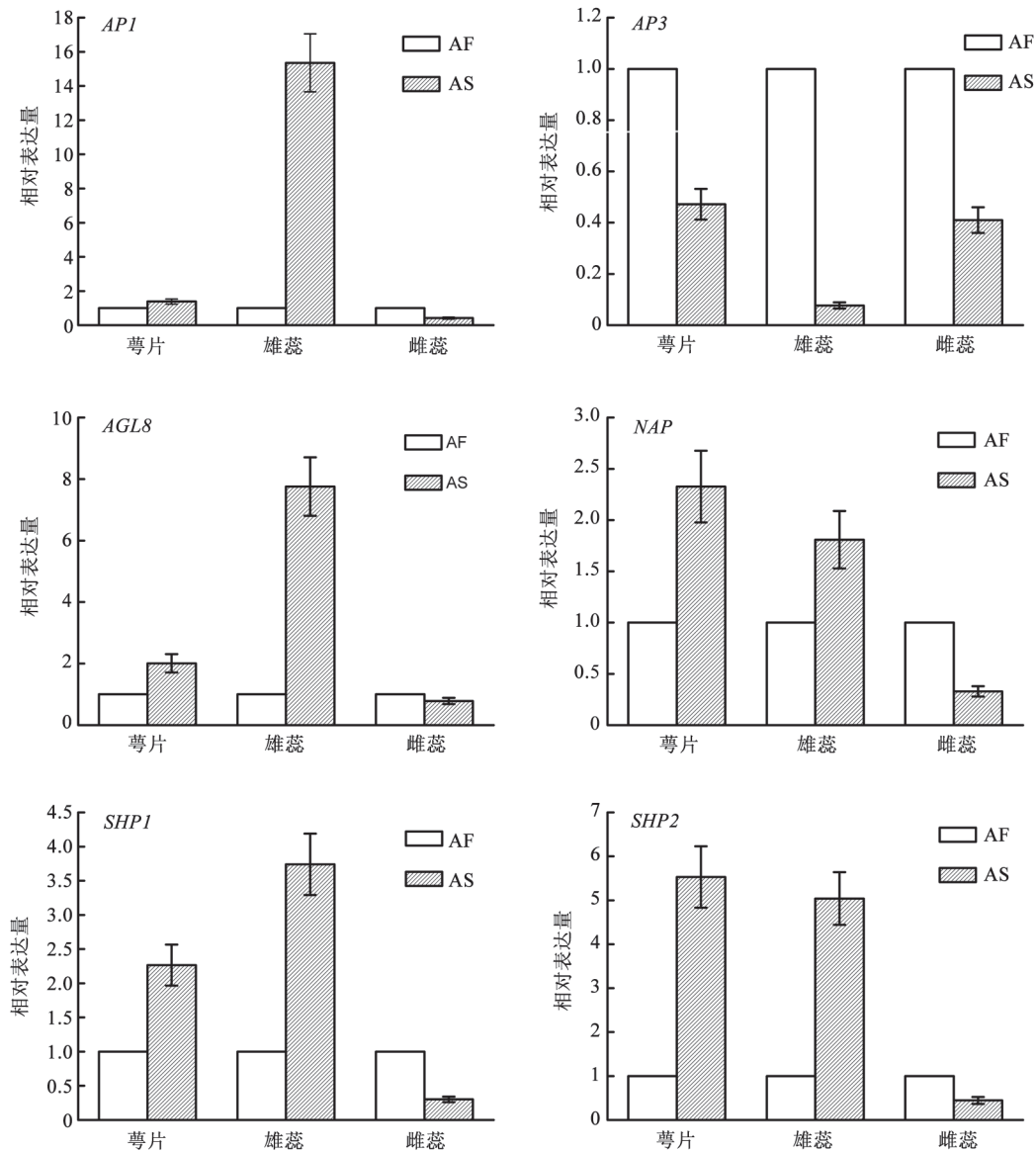


图5 花发育相关基因在AF和AS不同花器官中的的相对定量表达分析
Fig.5 Genes relative quantity expression in different floral organs of AF and AS

高等植物的花发育机制是一个相当复杂的过程, 涉及大量的基因及基因之间的相互作用。决定花器官特异性的基因是通过花同源异型突变体而被发现的。花的同源异型突变是指花的某一重要器官被另一类花器官替代的现象, 对于揭示花发育机理具有十分重要的意义(孟征和许智宏1997)。同源异型基因的表达赋予器官一定的特性, 花器官特异性基因是从改变花器官的同源异型突变体中鉴定出来的。通过分析这些同源异型突变体的表型, Coen等(1991)先后提出了花器官发育的

“ABC模型”假说。该模型认为, 每一轮花器官的形成都是三组花器官特性基因形成独特的组合决定的: A组基因独自决定萼片的特性; A和B组基因在花瓣的形成中起作用; B和C组基因共同决定雄蕊的发育; C组基因单独决定心皮的特性(Coen和Meyerowitz 1991; Bowman等1991; Weigel和Meyerowitz 1994)。拟南芥B组基因*APETALA3* (*AP3*)和*PISTILLATA* (*PI*)编码MADS-Box转录因子, 以异二聚体形式结合, 调控花瓣、雄蕊的发育, 任一基因功能缺失都会产生花瓣萼片化、雄蕊心皮化突

变(Jack等1992; Goto和Meyerowitz 1994)。雄蕊心皮化突变使得雄蕊完全丧失,由此产生的雄性不育稳定、彻底,是一种新的雄性不育类型。这种现象在农作物中也有产生(陆光远等 2005; Leino等 2003; Linke等2003)。依据花发育ABC模型判定,花瓣萼片化、雄蕊心皮化同源异型表型是B组基因功能缺失引起的(Coen和Meyerowitz 1991)。

为了进一步确定这6个基因在AS和AF花器官中的表达差异,我们对这些基因进行了定量分析。用Tritol法提取AF和AS各轮花器官的总RNA,用TaKaRa SYBR ExScript RT-PCR Kit荧光定量PCR试剂盒进行定量分析,以油菜18S-rRNA为内参,并进行归一化分析各基因在二者之间的相对表达量差异。

由图5可知,API基因在可育花和不育花的萼片和雌蕊中表达量差异不明显,而在雄蕊中API的表达量差异非常明显,API在AS心皮化的雄蕊中表达量大约是正常AF雄蕊中的10倍。AP3基因在AS的各轮花器官中表达量都较AF低,在心皮化的雄蕊中这种差异更明显,比AF雄蕊低10倍左右,而在萼片和雌蕊中低1倍左右,进一步表明在AS不育花中A组基因API异位表达可能抑制B组基因AP3表达。

图5结果显示,C组基因AGL8、SHP1、SHP2、NAP在不育花的萼片和心皮化的雄蕊中的表达量都较可育花中高,而在雌蕊中较可育花低,而且AGL8在可育花和不育花雄蕊中的表达量差异最为明显。NAP编码一个NAC家族的转录因子,它作为C组基因AP3和PI的直接靶标从而调控花瓣和雄蕊的发育(Sablowski等1998)。AG的靶基因SHP1和SHP2调控心皮的发育,同时也与果实中种子的释放有关(Liljegren等2000)。在AG基因缺失的情况下,SHP基因可以促进心皮和胚珠的发育(Pinyopich等2003)。综上结果我们推断B组基因AP3在雄蕊中的表达量降低或丧失且C组基因AGL8、SHP1、SHP2、NAP在雄蕊中的异常表达,可能是引起甘蓝型无花瓣油菜雄蕊心皮化的主要原因,

具体的调控机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- 傅寿仲, 张洁夫, 陈玉卿, 戚存扣(1996). 油菜株型结构及其理想型研究. I. 有、无花瓣油菜株型结构比较. 中国油料, 18: 23~27
- 陆光远, 伍晓明, 陈碧云, 许鲲, 高桂珍, 李响枝(2005). 油菜雄蕊同源异型缺失突变体的发现及形态特征. 中国油料作物学报, 27: 28~31
- 孟征, 许智宏(1997). 高等植物的同源异型基因. 植物生理学通讯, 33 (3): 233~239
- Bowman J, Drews GN, Meyerowitz EM (1991). Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell*, 3: 749~758
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31~37
- Fray MJ, Evans EJ, Lydiate DJ, Arthur AE (1996). Physiological assessment of apetalous flowers and erectophile pods in oilseed rape (*Brassica napus*). *J Agri Sci*, 127: 193~200
- Goto K, Meyerowitz EM (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Gene Dev*, 8: 1548~1560
- Jack T, Brockman LL, Meyerowitz EM (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, 68: 683~697
- Leino M, Teixeira R, Landgren M, Glimelius K (2003). *Brassica napus* lines with rearranged *Arabidopsis* mitochondria display CMS and a range of developmental aberrations. *Theor Appl Genet*, 106: 1156~1163
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed HY, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, 404: 766~770
- Linke B, Nothnagel T, Börner T (2003). Flower development in carrot CMS plants: mitochondria affect the expression of MADS box genes homologous to *GLOBOSA* and *DEFICIENS*. *Plant J*, 34: 27~37
- Pinyopich A, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, 424: 85~88
- Rao MSS, Mendham NJ, Buzza GC (1991). Effect of the apetalous flower characteristic on radiation distribution in the crop canopy, yield and its components in oilseed rape (*Brassica napus*). *J Agri Sci*, 117: 189~196
- Sablowski RW, Meyerowitz EM, Yanofsky MF (1998). A homolog of *NO APICAL ERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell*, 92: 93~103
- Weigel D, Meyerowitz E (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, 78: 203~209