

拟南芥角果发育和开裂的调控机制及在油菜育种中的应用

唐桂香* 秦叶波 宋文坚 周伟军

(浙江大学农业与生物技术学院农学系, 杭州 310029)

摘要 十字花科芸苔属甘蓝型油菜(*Brassica napus*)在角果发育成熟过程中, 因角果开裂种子散落引起产量损失最低达 20% 左右, 最高可达 50% 左右。模式植物拟南芥在角果形态和开裂机制方面与甘蓝型油菜具有相似性, 角果开裂主要与果瓣、胎座框和果瓣边缘层的细胞发育有关。通过对拟南芥角果发育期间基因对果瓣、胎座框和果瓣边缘层的识别和发育进行综述, 明确了拟南芥角果发育和开裂的基因调控机制, 提出了从模式植物到大田作物甘蓝型油菜抗裂角育种的新策略。

关键词 拟南芥; 角果发育和开裂; 甘蓝型油菜; 抗裂角育种

中国是世界上的油菜生产大国, 油菜面积和产量均占世界的 1/3, 菜籽油是我国的主要食用油, 除食用之外, 越来越多的科学家重视生物柴油的开发, 以菜籽油来代替石油, 缓解全世界的能源危机。与其他作物相比, 油菜角果易开裂, 开裂引起产量的损失达 20% 左右^[1], 在不利的气候条件下产量损失甚至可达 50%^[2]。角果开裂不仅引起产量的损失, 也不利于油菜的机械收割。角果开裂还带来自生苗的问题, 油菜收获后 20 天田间随机选择了 6 个点调查表明, 平均每平方米自生苗达 1 947.78 株。随着转基因油菜的大面积推广应用, 角果开裂种子散落增加了生态风险^[3], 同时也增加了使用除草剂去除再生苗的成本。对油菜生产者来说角果开裂是一个很重要的农艺性状, 但在油菜中很少有抗裂角变异。模式植物拟南芥与油菜具有相似的角果结构和开裂机制, 随着对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)角果发育和开裂机制的研究, 许多与角果发育和开裂有关突变体的筛选及基因的克隆^[4], 为油菜的抗裂角育种开辟了一条新途径。

1 拟南芥角果的发育和开裂

拟南芥果实是由二个心皮合生而成的复雌蕊结构, 复雌蕊由柱头、花柱、子房和雌蕊柄组成, 所形成的果实被称为角果^[5], 含有两室子房, 有两片线状果瓣(valve)、胎座框(replum)、两果瓣间假隔膜(replum)和果瓣边缘(valve margin)组成。果瓣由于子房壁发育而来, 用来包围种子和保护种子, 随种子的发育而伸长, 当角果成熟时, 果瓣从果瓣边缘即离层

(dehiscence zone, DZ)分离, 角果开裂种子散落。Smyth 等^[6]将拟南芥花和角果发育分为 20 期, 1 到 12 期花、雌蕊和雄蕊发育阶段; 13 期开始开花并自花授粉; 14、15 期出现授精; 16 期花萼、花瓣和雄蕊凋萎, 角果形成; 17 期果瓣完全伸长, 果瓣边缘和内果皮层木质化, 外果皮层分解; 18 期果瓣变黄; 19 期果瓣干燥, 呈品种固有颜色, 果瓣边缘出现离层; 20 期种子成熟, 果瓣开裂, 种子从胎座框和瓣膜间散落。

拟南芥角果发育突变体的研究表明, 角果开裂主要与果瓣内果皮层 b(endocarp b, enb)和果瓣边缘木质化有关^[7]。拟南芥和芸苔属作物的角果果瓣均由外果皮(exocarp)、中果皮(mesocarp)和内果皮(endocarp)组成。外果皮是果瓣最外层呈长方形细胞, 且在长方形细胞间散布着气孔能进行呼吸作用和蒸腾作用; 中果皮是由含叶绿体的薄壁细胞组成, 在角果发育期间能进行光合作用提供养分, 供种子生长用; 内果皮由木质化 enb 和薄壁细胞内果皮层 a(ena)组成, 在角果发育成熟过程中, ena 薄壁细胞层细胞分解收缩, 施加压力给 enb 层, 使果瓣开裂。果瓣边缘位于果瓣与胎座框之间, 由分离层和木质化层组成, 分离层薄壁细胞能够分泌水解酶, 溶解中间薄层, 使细胞分离^[8]; 而木质化层与 enb 层相连, 产生张力, 使得果瓣能像弹簧一样被弹开来, 在成熟干燥时易于开

收稿日期: 2007-06-25 接受日期: 2007-09-06

国家自然科学基金资助项目(No.30471023)

* 通讯作者 Tel: 0571-86971620, Fax: 0571-86971117, E-mail: tanggx@zju.edu.cn

裂, 种子散落^[9]。

2 与拟南芥果瓣和果瓣边缘发育有关的基因

拟南芥角果的开裂主要与*enb*和果瓣边缘层发育有关。目前与*enb*发育的相关基因还不十分清楚^[10], 而与果瓣边缘层识别和发育的基因主要有两类, 一类是与果瓣边缘发育直接有关的基因, 如MADS-box (*MCMI*, *AGAMOUS*, *DEFICEENS* 和 *SRF*) *SHATTER-PROOF* (*SHP1*, *SHP2*)^[7]、*INDEHISCENT* (*IND*)^[11]基因和bHLH (basic helix loop helix domain) 转录因子 *ALCATRAZ* (*ALC*)^[12]基因; 另一类是通过果瓣和胎座框的发育间接控制果瓣边缘层发育的基因, 如与果瓣发育有关的MADS-box *FRUITFULL* (*FUL*)^[13]基因和与胎座框发育有关的 *BEL1L* 同源结构域转录调节因子 *RPLUM* (*RPL*)^[14]基因。

2.1 *FUL* 基因

FUL 基因是MADS-box 基因延伸家族的一个成员, 是授精后第一个与角果发育识别有关的基因。*FUL*基因与果瓣细胞发育有关, 可以促进果瓣细胞的正常生长、分化和防止果瓣细胞木质化^[13,15], *FUL* 还反向调节 *SHP* 表达, 防止果瓣边缘层形成; 在异常表达的35S: *FUL* 角果中, *FUL* 组成型表达果瓣边缘层不发育^[16]。*ful* 突变体除了角果发育的变化外, 还表现为茎生叶的不正常发育, 茎生叶更宽, 且叶肉组织存在维管束缺陷^[13]。

FUL 基因在果瓣中强烈表达, 与*ful* 突变体缺失位置相一致。在花发育过程中, *FUL* 首先在第3期花生长点的中央区检测到表达, 这一区随后形成心皮, 当心皮发育时, *FUL* 被限制到果瓣中表达, *FUL* 也可在花柱和花序生长点中表达, 具有促进开花和叶片生长的作用^[13]。

2.2 *SHP* 基因

SHP 编码2个密切相关的MADS-box 家族的转录因子 *SHP1* 和 *SHP2*。*SHP1* 和 *SHP2* 主要与果瓣边缘层的识别、分离层及木质化层的分化有关^[7]。*shp1*、*shp2* 突变体的果瓣边缘不能形成木质化层和分离层, *SHP* 异常表达使得果瓣边缘层被识别成果瓣来发育且这些果瓣叶肉细胞异常木质化, 果瓣的伸长也减少, 类似于*ful* 的表现型。*SHP1* 或 *SHP2* 单个基因突变表现为角果开裂, 因此, *SHP1*、*SHP2* 对角果开裂是必需的, 它们对果瓣边缘层的分化和发育功能是冗余的。*shp1 shp2* 双突变体成熟时角果不开裂, 种子陷在果瓣中而野生型角果易开裂; 手掌间摩

擦 *shp1 shp2* 角果也不易开裂; 当使用外力时, *shp1 shp2* 角果果瓣被撕开但不是沿着果瓣边缘开裂^[16]。

刚开始 *SHP1* 和 *SHP2* 在胎座框、果瓣边缘、假隔膜和胚珠中都能进行表达, 以后随着雌蕊的发育成熟, *SHP1* 和 *SHP2* 只在果瓣边缘层表达^[7]。

2.3 *ALC* 基因

ALC 编码bHLH转录因子, 它主要与果瓣边缘分离层的识别和发育有关^[12]。与*shp1 shp2* 突变体相似, *alc* 突变体角果也不开裂, 但在外力作用下易开裂。*alc* 突变体角果果瓣边缘出现了木质化层, 但分离层细胞被撕裂没有分离; 而野生型角果果瓣边缘没有出现木质化的分离层细胞; 更有甚者是*alc* 突变体角果果瓣边缘木质化层、*enb* 和胎座框的木质化维管组织三者联结在一起形成了木质化桥, 木质化桥以及没有分离能力的分离层细胞, 使得*alc* 突变体角果不能开裂^[12]。

授精前 *ALC* 能在复雌蕊内广泛地表达, 但在角果发育16期, 限制了离层区形成; 角果发育第17期, *ALC* 继续在果瓣边缘表达, 并在胎座框细胞中也进行表达; 角果发育第18期, 果瓣边缘的分离层细胞可见 *ALC* 的表达, *ALC* 的表达防止了分离层细胞的异常木质化, *ALC* 也能在柱头、胚珠、蜜腺、新叶、根原基和果柄分枝点组织中表达, 但在这些组织中表达的机制还不清楚^[12]。

2.4 *IND* 基因

与 *ALC* 类似, *IND* 也是编码bHLH转录因子, 但属于非典型的bHLH, 在基本区域的氨基酸序列中, 野生型 *IND* 中的丙氨酸被谷氨酸所代替, bHLH 之间常形成同源或异源二聚体, 共同对基因的转导和识别起作用^[11]。*IND* 主要与果瓣边缘分离层和木质化层识别和发育有关。与 *SHP1*、*2*、*ALC* 相比, 在现有的与角果开裂有关的突变体中, *IND* 对果瓣边缘发育的影响是最大的。*ind* 突变体角果不能形成果瓣边缘分离层和木质化层且比 *shp* 或 *alc* 突变体更为严重^[11]。

与 *SHP1*、*SHP2* 和 *ALC* 不同, *IND* 为授精前在果瓣边缘层表达, 且 *IND* 突变体角果果瓣伸长、果瓣表皮细胞和气孔的生长均不受影响^[11]。

2.5 *RPL* 基因

RPL 编码 *BEL1L* 同源结构域转录因子, 主要与胎座框的发育有关。早期研究表明, *BEL1L* 转录因子可以抑制MADS-box 转录因子^[14], 如 *BEL1L* 通过反向调节MADS-box *AGAMOUS* 基因^[17,18]部分调节着胚

珠的发育; *RPL* 也通过反向调节 *MADS-box SHP* 基因来调节胎座框的发育。

rpl 突变体中, 胎座框细胞被识别成果瓣边缘分离层细胞来发育, 所形成的角果不含胎座框结构; 但当 *SHP* 基因不在胎座框中表达时, 胎座框细胞的识别和发育即被恢复。与 *FUL* 基因相似, *RPL* 对胎座框细胞的发育具冗余作用, 可通过反向调节 *SHP* 基因, 防止将胎座框发育成果瓣边缘层^[14]。

RPL 在所有组织中都能检测到表达, 但最高是在茎、带有花芽的花序和盛开的花朵中, 原位杂交表明花发育早期(第 7 和第 8 期)在雌蕊中间部分可见 *RPL* 的表达, 胎座框、假隔膜中也能检测到该基因的表达^[14]。

2.6 拟南芥角果发育与开裂的基因调控模式

拟南芥角果发育与开裂的基因调控模式见图 1^[19]。控制拟南芥角果发育和开裂的基因主要有: 与果瓣发育有关的 *FUL* 基因和与胎座框发育有关的 *RPL* 基因; 与果瓣边缘层(即离层)发育有关的 *SHP1*、*SHP2*、*IND* 和 *ALC* 基因。各基因间是相互作用的, *FUL* 和 *RPL* 可反向调节 *SHP1*、*SHP2*、*IND* 和 *ALC* 基因在果瓣边缘层的表达; *SHP1*、*SHP2* 正向调节 *IND*、*ALC* 基因, *IND* 与果瓣边缘木质化层和分离层的识别和发育有关, *ALC* 则与果瓣边缘分离层的识别和发育有关^[11,19]。同时与侧生器官极性发育有关的 *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* 和 *YABBY3 (YAB3)* 基因^[20,21,22] 分别促进了 *FUL* 和 *SHP* 基因的表达^[23], 促进侧生器官组织生长的 *JAGGED (JAG)* 基因^[19] 也与 *FIL*

和 *YAB3* 一起促进了 *FUL* 和 *SHP* 基因的表达^[23]。

IND、*SHP* 和 *ALC* 均编码转录调节因子, 在果瓣边缘层的识别和发育中起重叠作用。Liljergren 等^[11] 研究表明 *SHP* 正向调节 *IND* 和 *ALC*, 在 *shp1* 和 *shp2* 突变体中没有检测到 *IND* 和 *ALC* 在果瓣边缘层的表达; *IND* 和 *ALC* 又是 *SHP* 的下游调节因子, 但它们也独立起作用。各突变体果瓣边缘层发育的丧失表现为: *ind alc* 突变体角果果瓣边缘的丧失与 *ind* 相似; 而 *ind alc shp1 shp2* 突变体角果果瓣边缘的丧失比 *ind shp1shp2* 突变体更严重, 这说明 *ALC* 的功能是 *IND* 的一部分, 它们之间能形成异源二聚体共同对果瓣边缘的识别和发育起作用。 *SHP* 从 *IND* 中分离出来, 它们之间也有轻微的互作, *ind shp1 shp2* 突变体果瓣边缘层的缺失大于 *ind* 突变体, 而 *shp1 shp2* 突变体果瓣边缘层的缺失最弱。35S: *IND* 在拟南芥中异常表达, 果瓣边缘层的缺失比 35S: *SHP* 更强烈, 角果结构与 *ful* 突变体更接近^[19]。

拟南芥角果中, 基因如何识别和调控 *enb* 层发育至今还是个谜, *MADS-box AGAMOUS* 基因是唯一与 *enb* 细胞识别和发育有关的基因, 该基因正向调节 *SHP* 在果瓣边缘层的表达。通过对拟南芥 *ind alc shp1 shp2 ful* 五重突变体的研究表明, 该突变体中没有发现正常的 *enb* 层细胞, 说明 *IND*、*SHP*、*ALC* 和 *FUL* 基因都与这层细胞的识别和发育有关, 且 *IND*、*SHP*、*ALC* 和 *FUL* 对 *enb* 层细胞的识别和发育具冗余作用。在这些基因中, *FUL* 可能是 *enb* 细胞发育的主要决定因子, 但 *IND*、*SHP* 和 *ALC* 基因的存在也对这层细胞的识别和发育起作用; 同时果瓣边缘木质化层的发育与角果的开裂也是息息相关的, 这说明果瓣边缘分离层、果瓣边缘木质化层和果瓣 *enb* 层的识别和发育都是受同一套基因控制的^[11]。 *FUL* 和 *RPL* 则通过反向调节 *SHP* 基因防止把果瓣组织和胎座框组织识别成果瓣边缘层组织发育, 从而防止果瓣开裂种子散落^[11,15]。

3 甘蓝型油菜抗裂角育种

栽培油菜包括甘蓝型油菜(*B. napus*)、白菜型油菜(*B. campestris*)、芥菜型油菜(*B. juncea*)和埃塞俄比亚芥(*B. carinata*), 而栽培面积最多的是甘蓝型油菜。作为栽培作物的油菜和模式植物拟南芥在 2000 万年前属同一祖先, 且同属十字花科 (*Cruciferae*), 它们在角果结构和开裂机制方面具有相似性。油菜和拟南芥角果均属圆筒型长角果, 有两片线状果瓣, 两

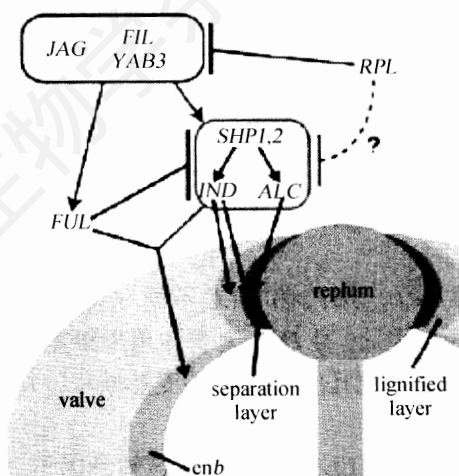


图 1 拟南芥角果发育和开裂基因控制模式^[19]

Valve 表示果瓣; replum 为胎座框; enb 为木质化的内果皮层; separation layer 为果瓣边缘分离层; lignified layer 为果瓣边缘木质化层。

果瓣间有假隔膜相联^[24]。二果瓣角果两侧有包含果瓣边缘层即离层的连接处, 它由一层 3-4 个细胞宽的简单的薄壁组织细胞和一层木质化细胞组成, 离层位于果瓣边缘和包含有通向果柄的主要维管束的中央假隔膜之间^[9]。油菜角果开裂与拟南芥相似, 均与果瓣边缘层和 *enb* 层的发育有关。

在油菜生产中角果开裂是极其不利的, 一方面引起产量的下降, 带来田间自生苗的问题, 另一方面也不利于油菜的机械收割。油菜抗裂角性属隐性性状, 受 2~3 个基因控制, 现有的甘蓝型油菜中很少有抗裂角的变异, 但在人工合成的甘蓝型油菜及别的芸薹属植物如芥菜型油菜、埃塞俄比亚芥、黑芥和野生的白菜、甘蓝中含有抗裂角的变异。Morgan 等^[25,26]利用野生的含有抗裂角性状的白菜(*B. rapa* ssp. *chinensis*)和芥蓝(*B. oleracea* var. *alboglabra*)杂交, 采用胚挽救和小孢子培养等技术人工合成了甘蓝型油菜, 并与常规品种多代回交, 将抗裂角性状转入甘蓝型油菜中。在我们的研究中发现, 很多抗裂角品系难以在生产上利用, 许多品系没有好的农艺性状。在抗裂角育种研究中发现, 油菜抗裂角不仅受基因型的影响也受角果的成熟度、种植密度和植株形态建成的影响等; 如何更准确有效地评价角果开裂, 也是我们在研究油菜角果抗裂角性时值得探讨的问题。

很多与拟南芥角果发育相似的突变体在油菜中也被发现, Meakin 等^[8]发现了没有胎座框的角果; 我们发现了与拟南芥 *ful* 基因相似的突变体, 表现为角果果瓣不伸长, 果瓣因种子发育没有足够的空间供种子生长用而被撕裂(图 2)。进一步研究表明, 该突变

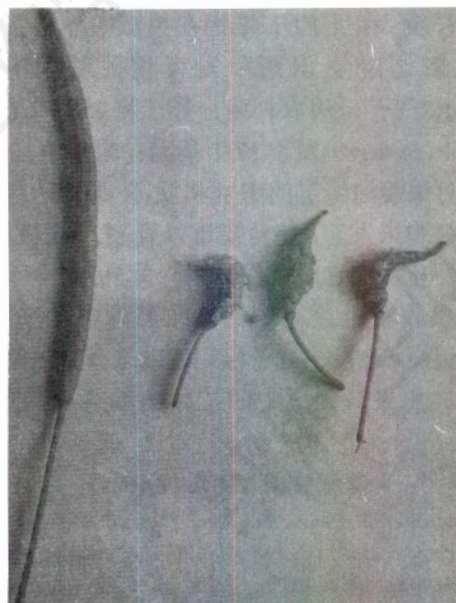


图 2 甘蓝型油菜角果发育突变体(未发表资料)
左边为野生型角果, 右边三个角果为突变体角果。

体的株高、角果大小和茎生叶的大小均比野生型要小(数据未显示)。开花后 25 天角果果瓣显微结构观察表明, 突变体果瓣中没有明显的果瓣边缘层且果瓣外果皮表皮细胞的大小、数目, 中果皮叶肉维管束层均有差异(图 3)。

随着对拟南芥角果发育机制的深入研究, 许多与角果发育和开裂有关基因的克隆, 利用这些基因来抑制油菜角果开裂和防止种子损失已成为可能。如采用 RNA 干扰的方法, 减少 *SHP*、*IND* 和 *ALC* 基因在果瓣边缘层表达, 从而抑制果瓣边缘的形成^[10,16], 防

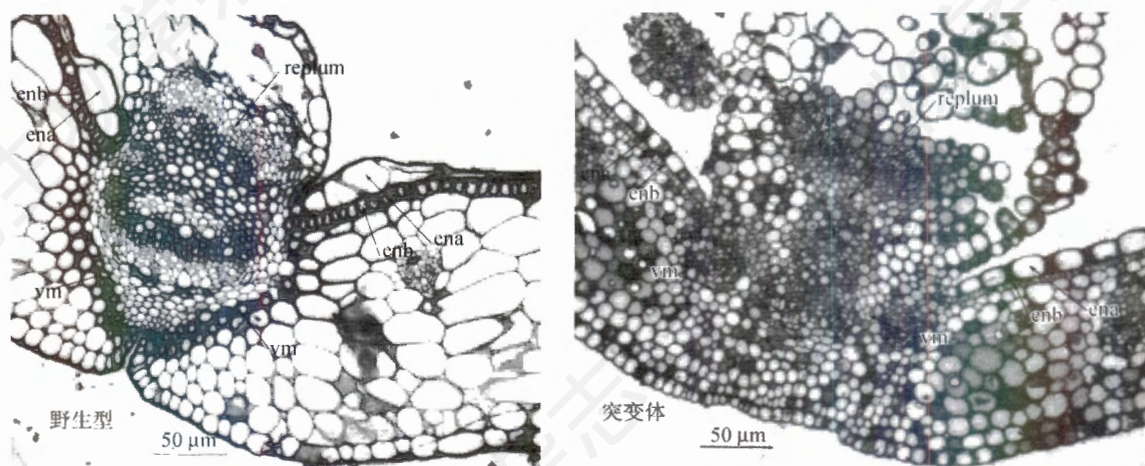


图 3 野生型和突变体角果在开花后 25 天角果果瓣的超微结构(未发表资料)

enb 为木质化内果皮层, ena 为薄壁细胞内果皮层; replum 为胎座框; vm 为果瓣边缘, bar 代表 50 μm 。

止角果开裂;相反 *FUL* 基因在果瓣中异常表达可抑制与果瓣边缘层识别和发育相关基因的表达。Østergaard 等^[27]采用农杆菌介导法将 35S:*FUL* 基因转入黑芥中(*B. nigra*)发现 *FUL* 基因在果瓣中异常表达,抑制了对果瓣边缘层的识别和发育,果瓣边缘层被当作果瓣细胞来发育,使角果难以开裂,同时也产生了一些角果开裂适宜的后代品系。此外,完全不开裂对油菜角果收获也是不利的,在育种中可采用 QTL (quantitative trait loci) 分子标记辅助选择方法筛选自然变异的、角果开裂适中的抗裂角油菜新品系^[10]。

参考文献 (References)

- [1] Price JS *et al.* *J Agric Eng Res*, 1996, **80**: 343
- [2] Macleod J *et al.* *Oilseed Rape Book*, Cambridge Agricultural Publishing, 1981, 107
- [3] 唐桂香等. *应用生态学报*, 2005, **16**: 2465
- [4] Roeder AHK *et al.* *The Arabidopsis Book: Fruit Development in Arabidopsis*, American Society of Plant Biologists, 2005
- [5] Bowman JL *et al.* *Curr Top Dev Biol*, 1999, **45**: 155
- [6] Smyth DR *et al.* *Plant Cell*, 1990, **2**: 755
- [7] Liljegren SJ *et al.* *Nature*, 2000, **404**: 766
- [8] Meakin JP *et al.* *J Exp Bot*, 1990, **41**: 955
- [9] Spence J *et al.* *J Microscopy*, 1996, **181**: 195
- [10] Dinney JR *et al.* *BioEssays*, 2005, **27**: 42
- [11] Liljegren, SJ *et al.* *Cell*, 2004, **116**: 843
- [12] Rajani S *et al.* *Curr Biol*, 2001, **11**: 1914
- [13] Gu Q *et al.* *Development*, 1998, **125**: 1509
- [14] Roeder AH *et al.* *Curr Biol*, 2003, **13**: 1630
- [15] Ferrándiz C *et al.* *Development*, 2000, **127**: 725
- [16] Ferrándiz C *et al.* *Science*, 2000, **289**: 436
- [17] Modrusan Z *et al.* *Plant Cell*, 1994, **6**: 333
- [18] Western TL *et al.* *Plant J*, 1999, **18**: 329
- [19] Dinneny JR *et al.* *Development*, 2005, **132**: 4687
- [20] Eshed Y *et al.* *Development*, 2004, **131**: 2997
- [21] Sawa S *et al.* *Genes Dev*, 1999, **13**: 1079.
- [22] Siegfried KR *et al.* *Development*, 1999, **126**: 4117
- [23] Ohno CK *et al.* *Development*, 2004, **131**: 1111
- [24] 刁操铨等. *作物栽培学各论*, 北京: 中国农业出版社, 1994, 307
- [25] Morgan C *et al.* *Field Crops Res*, 1998, **58**: 153
- [26] Morgan C *et al.* *Plant Genet Resour*, 2003, **1**: 59
- [27] Østergaard L *et al.* *Plant Biotechnol J*, 2006, **4**: 45

Mechanism to Control Fruit Development and Disperse in *Arabidopsis* and the Application For Rapeseed (*Brassica napus*) Breeding

Gui-Xiang Tang*, Ye-Bo Qin, Wen-Jian Song, Wei-Jun Zhou

(Department of Agronomy, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, china)

Abstract It has been reported that 20% of harvest are lost as a result of fruit development and disperse in maturity and losses up to 50% were estimated in seasons when adverse weather conditions delayed harvesting in rapeseed (*Brassica napus* L.). The model plant, *Arabidopsis thaliana*, is the same family with rapeseed and has similar fruit structure and dehiscence mechanism. An intricate process which is related with the fruit development and dehiscence had been clear in *Arabidopsis thaliana*. Three tissues which were valve or pod wall, replum and valve margin were associated with fruit disperse in *Arabidopsis thaliana* during fruit development and maturity. A series of genes had been identified to regulate three tissue's specify and development. This paper reviewed the mechanism of genes control fruit dehiscence in *Arabidopsis* and provided tools to engineer shatter-resistant pods to prevent seed loss in rapeseed.

Key words *Arabidopsis thaliana*; fruit development and dehiscence; *Brassica napus*; pod-shattering resistance breeding

Received: June 25, 2007 Accepted: September 6, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471023)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971620, Fax: 86-571-86971117, E-mail: tanggx@zju.edu.cn