

# 纯雌系苦瓜花经 $\text{AgNO}_3$ 诱雄后的雄蕊发育和基因表达

王日升<sup>1,2,3</sup> 李杨瑞<sup>2\*</sup> 周生茂<sup>3</sup> 张曼<sup>3</sup> 方锋学<sup>3</sup> 杨丽涛<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>广西大学广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530005; <sup>2</sup>广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007; <sup>3</sup>广西农业科学研究院蔬菜研究中心, 南宁 530007)

**摘要** 为了研究  $\text{AgNO}_3$  诱导下纯雌系苦瓜花蕾发育过程中的差异基因表达, 本文运用形态学观察、cDNA-AFLP、RT-PCR 和反向 Northern 杂交等技术在形态学和转录组学水平上对花蕾雄蕊进行了研究。结果显示: (1)花蕾在  $\text{AgNO}_3$  处理后第 6 天出现雄蕊, 第 14 天形成两性花, 而且两性花中的花粉具有完全生活力, 第 22 天后恢复全雌花; (2)从 128 对引物组合中筛选出可获得丰富清晰条带的引物组合 36 对, 它们从  $\text{AgNO}_3$  处理的花蕾中分离到 11 个高度表达的差异片段, 经克隆、测序和在线比对, 有 2 个未知基因, 9 个已知基因, 其中 1 个与植物性别分化有关的 *CYP450* 家族基因有高度同源性, 命名为 *McCYP72A1*; (3) *McCYP72A1* 在  $\text{AgNO}_3$  处理后 2~12 h 内的花蕾中表达, 而且在第 8 h 时表达丰度最高, 但在处理的根、茎和叶以及对照的各个器官中不表达。结果表明,  $\text{AgNO}_3$  处理可诱导纯雌系苦瓜花蕾中与雄性分化相关基因表达, 进而可能导致处理后 14 天内雌花发育为两性花。

**关键词** 苦瓜; 纯雌系; 诱雄处理; cDNA-AFLP; 差异基因表达

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 为葫芦科 (*Cucurbitaceae*) 苦瓜属 (*Momordica*) 一年生草本植物, 嫩瓜富含维生素 C 和苦瓜素等成分<sup>[1,2]</sup>, 是炎热季节的主选蔬菜之一。近年来, 苦瓜在全国尤其南方各地栽培面积逐年扩大, 苦瓜杂交种需求量逐年增加, 但苦瓜杂交制种工作量大且成本高等因素在一定程度上制约了苦瓜杂交种的应用, 导致生产上仍以常规品种为主<sup>[3]</sup>。所以, 应用雄性不育技术简化杂交制种对苦瓜杂种优势利用具有重要现实意义。

雄性不育是有花植物普遍存在的一种自然现象, 通常包括雄蕊退化和花粉不育两种类型。自 1763 年 Kuehter 首次报道植物雄性不育以来, 至今已在 43 科 162 属 617 种植物中发现了雄性不育<sup>[4]</sup>, 其中单子叶禾本科植物和双子叶茄科、豆科、十字花科等植物的雄性不育研究最为广泛, 它们的雄性不育系不仅用来简化杂交制种程序, 而且其不育性和杂种优势一直是研究热点之一<sup>[5]</sup>。葫芦科植物是雌雄同株异花授粉植物, 雌雄分化受遗传背景、光温和化学物质等多种因素的控制<sup>[6]</sup>, 因而很难获得其不育系(纯雌系), 即使获得了纯雌株系, 也因无法有效保存纯雌株系而限制了其在大规模杂交制种中的应用。自从具有诱导黄瓜<sup>[7]</sup>、节瓜<sup>[8]</sup>、西葫芦<sup>[9]</sup>、瓠瓜<sup>[10]</sup>和苦瓜<sup>[11]</sup>等

葫芦科植物产生雄花/两性花的化学物质被报道后, 葫芦科植物纯雌株系用于大规模杂交制种的问题才得到解决。黄瓜和苦瓜纯雌株系最有效的诱雄物质是  $\text{AgNO}_3$ , 研究表明  $\text{AgNO}_3$  诱导黄瓜雌性系雄花分化是由于  $\text{Ag}^+$  能抑制乙烯部分氧化代谢途径, 阻碍乙烯原初反应的发生, 最终抑制黄瓜雌花的产生<sup>[7]</sup>。但是  $\text{AgNO}_3$  诱导苦瓜雌性系雄性分化机制是否如此尚不清楚, 因此, 研究  $\text{AgNO}_3$  诱导下纯雌系苦瓜花蕾发育过程中的差异基因表达很有必要。

本研究以我们选育并应用于杂交制种的苦瓜纯雌系“X-黑-d-d”为材料, 在三叶一心期用  $\text{AgNO}_3$  处理苦瓜后, 首先观察雄蕊形态及其花粉活力, 然后利用 cDNA-AFLP、RT-PCR 和反向 Northern 杂交等技术研究  $\text{AgNO}_3$  诱导下纯雌系苦瓜花蕾发育过程中的差异基因表达, 为化学调控苦瓜性别分化和进一步通过遗传工程手段创建新的苦瓜雌性系提供理论依据。

收稿日期: 2009-01-14 接受日期: 2009-06-11

国家科技支撑计划项目(No.2007BAD68B03)、公益性行业(农业)科研专项(No.nyhyzx07-007-1)、广西青年基金项目(No.桂科青0991077)、广西自然科学基金项目(No.桂科自0728065)和广西作物遗传生物技术重点开放实验室开放课题(No.桂科能0815011-6-1-14)资助

\* 通讯作者。Tel: 0771-3247689, E-mail: liyr@gxaas.net

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以广西农科院蔬菜中心选育的苦瓜纯雌系“X-黑-d-d”为研究材料,种子在温度  $29\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  和相对湿度  $90\%\pm 5\%$  条件下催芽 2 天露白后,播于大棚中。根据前期研究  $\text{AgNO}_3$  诱雄的最佳处理时期和浓度,在苦瓜三叶一心期用  $300\text{ mg/L AgNO}_3$  进行全株喷施至叶冠上液滴形成为止,对照喷施蒸馏水。处理后 2、4、6、8、10 和 12 h 分别采集对照和处理的蕾、根、茎和叶,并进行雄蕊形态观察及其花粉活力鉴定。

TRIzol Kit 购自 Invitrogen 公司; rTaq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体购自 Takara 公司; SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit 购自 Clontech 公司;  $\text{AgNO}_3$ 、苯胺蓝、EcoRI、MseI、IPTG、X-Gal、 $T_4$  DNA 连接酶、Acrylamide、Bis-adrylamide、尿素、过硫酸铵、TEMED、购自上海生物工程技术服务有限公司,接头和引物序列由上海生物工程技术服务有限公司合成; PCR DNA Marker III 购自天根生化科技(北京)有限公司; Biospin Polyacrylamide Gel DNA Extraction Kit 和 DNA 凝胶回收试剂盒分别购自 Bioer Technology 公司和上海华舜生物工程有限公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司。

### 1.2 雄蕊形态观察和花粉活力鉴定

$\text{AgNO}_3$  处理后观察雄蕊是否正常,花药有无花粉;采用以苯胺蓝染色的荧光显微技术鉴定花粉生活力<sup>[12]</sup>,参照刘乐承等<sup>[13]</sup>所述方法进行花粉萌发。

### 1.3 总 RNA 提取与双链 cDNA 合成

参照 Trizol<sup>®</sup> 产品手册提取总 RNA,用 SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA,其中 3' 端和 5' 端接头序列分别为 3' RAS 和 5' RAS (表 1),检测合格

后备用。

### 1.4 cDNA-AFLP 分析

参照 Bachem 等<sup>[14]</sup>和黄科等<sup>[15]</sup>的方法进行 cDNA-AFLP 分析,接头和引物序列见表 1,其中 EAS1 和 EAS2 为 EcoRI 酶切后的接头序列, MAS1 和 MAS2 为 MseI 酶切后的接头序列, EPS1~EPS6 和 MPS1~MPS6 分别为 AFLP 引物序列。采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,1500 V 电泳至二甲苯氰距下部边沿 10 cm 处停止电泳,参照 Sanguinetti 等<sup>[16]</sup>方法进行银染。

### 1.5 差异片段的回收、克隆、测序和分析

用 Biospin Polyacrylamide Gel DNA Extraction Kit 回收聚丙烯酰胺凝胶板上的差异片段,用 AFLP-PCR 扩增的相应选扩引物进行二次扩增,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,二次扩增回收产物与载体连接和转化;用碱裂解法小量提取质粒 DNA,分别挑选经酶切鉴定为阳性克隆的 3 个菌液送上海生工测序;测序结果在 NCBI 数据库中进行网上比对,以确定差异片段是否为已知基因。

### 1.6 差异片段假阳性的反向 Northern 杂交分析

参照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 进行反向 Northern 杂交验证。首先分别将对对照和处理各时期花蕾 cDNA 等浓度混合,用地高辛分别标记反向 Northern 杂交的混合探针,然后将二次扩增回收产物点在尼龙膜上,最后进行杂交、漂洗和拍照。

### 1.7 差异基因表达的 RT-PCR 分析

根据前述 BLAST 比对和反向 Northern 杂交结果,选取处理表达丰度强的 CYP72A 基因片段进行时空表达分析。参照植物中普遍表达的 Actin1 基因<sup>[17]</sup>合成上、下游引物 AFS 和 ARS (表 1)作为时空表达的内参照系,在 CYP72A 基因片段序列上设计上、下游特异引物 CFS 和 CRS (表 1);分别以处理各时期

Table 1 The sequences of both adaptors and primers used

Name	Sequences	Name	Sequences
3'RAS	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'	5'RAS	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGAC-ATG(T) <sub>30</sub> (A/G/C)(A/G/C/T)-3'
EAS1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	MAS1	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
EAS2	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'	MAS2	5'-GACGATGAGTCTCTGAG-3'
EPS1	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'	MPS1	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
EPS2	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'	MPS2	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
EPS3	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'	MPS3	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
EPS4	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'	MPS4	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
EPS5	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'	MPS5	5'-GATGAGTCCTGAGTAACACT-3'
EPS6	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'	MPS6	5'-GATGAGTCCTGAGTAACACTG-3'
CFS	5'-CAGAGAGATTCTCAGAGGGAG-3'	CRS	5'-AACGTAGGGTGACTACCATT-3'
AFS	5'-TCTCTATGCCAGTGGTCGTA-3'	ARS	5'-CCTCAGGACAACGGAATC-3'

花蕾 cDNA、处理各时期等浓度混合的根、茎及叶 cDNA、和对照各时期等浓度混合的根、茎、叶及花蕾 cDNA 为模板进行 RT-PCR 分析, 反应体系: 0.2  $\mu$ l cDNA (约含 15 ng), 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR 反应缓冲液(含 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 1.0  $\mu$ l 10 mmol/L dNTP, 10  $\mu$ mol/L 引物各 2  $\mu$ l, 0.2  $\mu$ l 1.0 U rTaq DNA 聚合酶, 加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ l; 扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环(该循环数线性关系最好); 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存; 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 拍照。

## 2 结果

### 2.1 雄蕊形态和花粉活力

对照主侧蔓上的花都为雌花。AgNO<sub>3</sub> 处理后连续 6 天雄蕊观察的结果表明, 尽管喷后 5 天内对照和处理的雄蕊形态没有明显差异, 但是从处理第 6 天开始能模糊看见雄蕊的花丝, 而对照没有, 此后二者差别明显, 第 14 天花呈半开放状态时, 雄蕊各部位完全形成(图 1A), 说明在三叶一心期喷施 AgNO<sub>3</sub> 能够有效地诱导纯雌系苦瓜雄性器官的形成进而使其发育为两性花。但是 AgNO<sub>3</sub> 作用效果仅保持 22 天, 此后只形成雌花。转雄后产生的花粉用苯胺蓝处理, 可在荧光显微镜下观察到椭圆形的花粉粒发出黄色荧光(图 1B), 而且用培养基培养的花粉能够正常萌发(图 1C), 说明转雄后产生大量有生活力的花粉。

### 2.2 cDNA-AFLP 引物筛选及差异表达基因片段的扩增

用从对照和处理的苦瓜花蕾中提取的总 RNA 合成 cDNA, 前者电泳显示有 28S、18S 和 5S 特征条带且未出现降解(图 2A), 后者主要分布在 300~4 500 bp(图 2B)。分别将对照和处理不同时期的 cDNA 等浓度混合用于 cDNA-AFLP 分析的引物筛选, 结果表明, 128 对引物组合中有 36 对引物(表 1)组合扩增的差异条带数目多、丰度高而且重复性好(图 2C); AgNO<sub>3</sub> 分别处理 2、4、6、8、10 和 12 h 后, 提取不同时期花蕾 cDNA, 经引物组合 EPS2/MPS3 扩增, 得到一个高度表达的片段(图 2D)。

### 2.3 差异表达基因片段的筛选和阳性验证

利用初步筛选出的 36 对引物组合进行对照和处理不同时期花蕾 cDNA 差异表达基因片段的筛选, 从处理扩增众多条带中挑选出 33 条显色强的差异带, 回收后分别用相应引物进行二次 PCR 扩增, 有 20 条片段扩增成功, 编为第 1~20 号, 分别将这 20 个二次扩增回收产物点于尼龙膜上, 用对照和处理 cDNA 混合

探针进行反向 Northern 杂交分析, 结果显示(图 3), 第 1、3、5、11、12、16、19 号片段在对照和处理的的花蕾中都有表达, 第 7、20 号片段在对照和处理的的花蕾中都没有表达, 所以这 9 个片段为假阳性片段, 其余 11 个片段为 AgNO<sub>3</sub> 处理后特异表达的阳性片段, 其中第 4 号基因差异片段表达丰度最强, 其次是第 13 号。

### 2.4 阳性基因片段功能预测和相关基因时空表达

11 个阳性片段克隆和测序后 Blast 结果显示, 除第 2、17 号为未知基因外, 其他均为已知基因(表 2), 这些已知基因功能涉及调节激素平衡、RNA 加工修饰、基因表达调控和能量代谢等。其中第 4 号片段大小为 300 bp, 可以翻译成 100 个氨基酸(图 2D), 与细胞色素 P450 超大基因家族中 CYP72A 亚家族的烟草 CYP72A58 同源性最高为 72% (登陆号: DQ350363.1), 该基因主要功能是调节激素平衡, 而激素与植物性别分化密切相关, 因此, 命名第 4 号片段为 *McCYP72A1*。*McCYP72A1* 基因的时空表达结果(图 4)表明, 该基因在 AgNO<sub>3</sub> 处理后 2~12 h 内的花蕾中表达, 表达模式为从开始逐渐增加, 至 8 h 时最强, 此后又渐渐减弱, 而在处理的根、茎和叶以及对照各个器官中均不表达。

## 3 讨论

苦瓜雌雄花通常共存于同一个植株, 两种类型的花在形成之前要经过一个共同发育时期, 然后才向各自的方向发育<sup>[18]</sup>。其他葫芦科植物也普遍存在这种雌雄性别分化现象, 在其性别分化前叶面喷施生长调节物质能够调控花发育方向和雌雄比例, 其中 AgNO<sub>3</sub> 可成功诱导其纯雌系转雄, 从而有效保存了用于杂交制种的纯雌系。目前研究发现, 植物乙烯合成途径的关键酶 ACC 合成酶和黄瓜雌性基因紧密连锁<sup>[19]</sup>, 而且乙烯受体基因在黄瓜雌性系中高度表达<sup>[20]</sup>。本研究用 300 mg/L AgNO<sub>3</sub> 在三叶一心期喷施纯雌系苦瓜, 花性别也成功实现了转雄分化, 不但花丝显著伸长, 而且花粉具有生活力; 同时利用 cDNA-AFLP 和反向 Northern 杂交等技术对处理花蕾中表达的差异基因进行了筛选和验证, 获得了 11 个与转雄相关的阳性基因片段, BLAST 比对后未发现与乙烯合成途径和受体相关的基因, 这可能和引物仅筛选了 128 对及主要挑选表达丰度强的条带分析有关。但我们筛选到一个属于细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 超大基因家族中 CYP72A 亚家族的一个成员 *McCYP72A1*, 其可能与 AgNO<sub>3</sub> 诱导纯雌系苦瓜产生了两性花而不是雄花有关。

花蕾 cDNA、处理各时期等浓度混合的根、茎及叶 cDNA、和对照各时期等浓度混合的根、茎、叶及花蕾 cDNA 为模板进行 RT-PCR 分析, 反应体系: 0.2 μl cDNA (约含 15 ng), 2.5 μl 10×PCR 反应缓冲液(含 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 1.0 μl 10 mmol/L dNTP, 10 μmol/L 引物各 2 μl, 0.2 μl 1.0 U rTaq DNA 聚合酶, 加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μl; 扩增条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 50 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环(该循环数线性关系最好); 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存; 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 拍照。

## 2 结果

### 2.1 雄蕊形态和花粉活力

对照主侧蔓上的花都为雌花。AgNO<sub>3</sub> 处理后连续 6 天雄蕊观察的结果表明, 尽管喷后 5 天内对照和处理的雄蕊形态没有明显差异, 但是从处理第 6 天开始能模糊看见雄蕊的花丝, 而对照没有, 此后二者差别明显, 第 14 天花呈半开放状态时, 雄蕊各部位完全形成(图 1A), 说明在三叶一心期喷施 AgNO<sub>3</sub> 能够有效地诱导纯雌系苦瓜雄性器官的形成进而使其发育为两性花。但是 AgNO<sub>3</sub> 作用效果仅保持 22 天, 此后只形成雌花。转雄后产生的花粉用苯胺蓝处理, 可在荧光显微镜下观察到椭圆形的花粉粒发出黄色荧光(图 1B), 而且用培养基培养的花粉能够正常萌发(图 1C), 说明转雄后产生大量有生活力的花粉。

### 2.2 cDNA-AFLP 引物筛选及差异表达基因片段的扩增

用从对照和处理的苦瓜花蕾中提取的总 RNA 合成 cDNA, 前者电泳显示有 28S、18S 和 5S 特征条带且未出现降解(图 2A), 后者主要分布在 300~4 500 bp(图 2B)。分别将对照和处理不同时期的 cDNA 等浓度混合用于 cDNA-AFLP 分析的引物筛选, 结果表明, 128 对引物组合中有 36 对引物(表 1)组合扩增的差异条带数目多、丰度高而且重复性好(图 2C); AgNO<sub>3</sub> 分别处理 2、4、6、8、10 和 12 h 后, 提取不同时期花蕾 cDNA, 经引物组合 EPS2/MPS3 扩增, 得到一个高度表达的片段(图 2D)。

### 2.3 差异表达基因片段的筛选和阳性验证

利用初步筛选出的 36 对引物组合进行对照和处理不同时期花蕾 cDNA 差异表达基因片段的筛选, 从处理扩增众多条带中挑选出 33 条显色强的差异带, 回收后分别用相应引物进行二次 PCR 扩增, 有 20 条片段扩增成功, 编为第 1~20 号, 分别将这 20 个二次扩增回收产物点于尼龙膜上, 用对照和处理 cDNA 混合

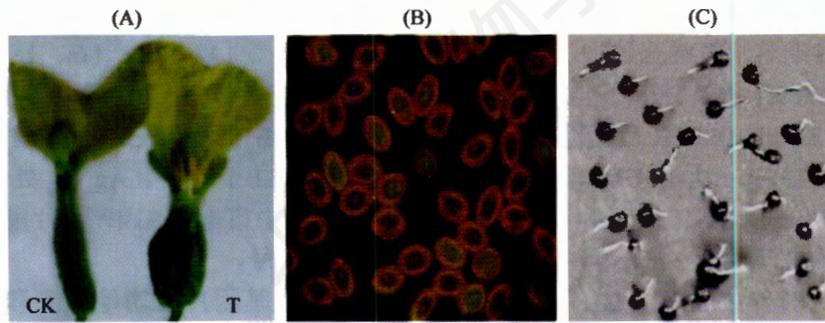
探针进行反向 Northern 杂交分析, 结果显示(图 3), 第 1、3、5、11、12、16、19 号片段在对照和处理的的花蕾中都有表达, 第 7、20 号片段在对照和处理的的花蕾中都没有表达, 所以这 9 个片段为假阳性片段, 其余 11 个片段为 AgNO<sub>3</sub> 处理后特异表达的阳性片段, 其中第 4 号基因差异片段表达丰度最强, 其次是第 13 号。

### 2.4 阳性基因片段功能预测和相关基因时空表达

11 个阳性片段克隆和测序后 Blast 结果显示, 除第 2、17 号为未知基因外, 其他均为已知基因(表 2), 这些已知基因功能涉及调节激素平衡、RNA 加工修饰、基因表达调控和能量代谢等。其中第 4 号片段大小为 300 bp, 可以翻译成 100 个氨基酸(图 2D), 与细胞色素 P450 超大基因家族中 CYP72A 亚家族的烟草 CYP72A58 同源性最高为 72% (登陆号: DQ350363.1), 该基因主要功能是调节激素平衡, 而激素与植物性别分化密切相关, 因此, 命名第 4 号片段为 *McCYP72A1*。*McCYP72A1* 基因的时空表达结果(图 4)表明, 该基因在 AgNO<sub>3</sub> 处理后 2~12 h 内的花蕾中表达, 表达模式为从开始逐渐增加, 至 8 h 时最强, 此后又渐渐减弱, 而在处理的根、茎和叶以及对照各个器官中均不表达。

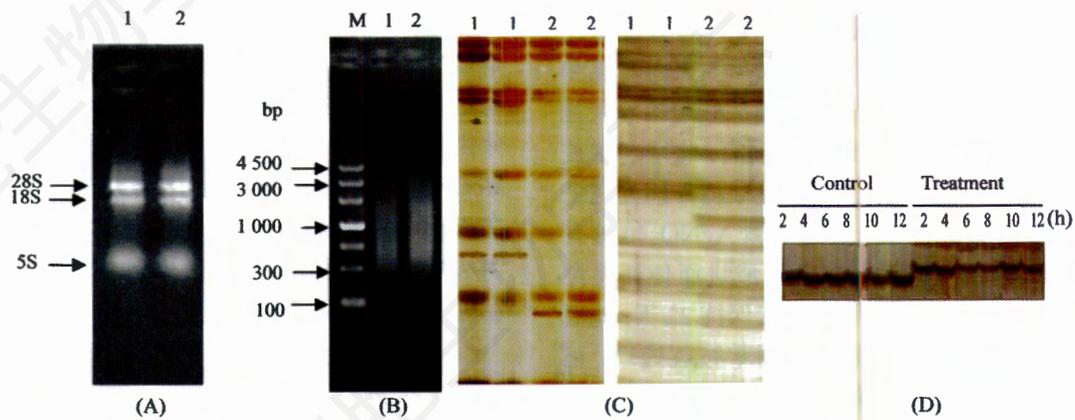
## 3 讨论

苦瓜雌雄花通常共存于同一个植株, 两种类型的花在形成之前要经过一个共同发育时期, 然后才向各自的方向发育<sup>[18]</sup>。其他葫芦科植物也普遍存在这种雌雄性别分化现象, 在其性别分化前叶面喷施生长调节物质能够调控花发育方向和雌雄比例, 其中 AgNO<sub>3</sub> 可成功诱导其纯雌系转雄, 从而有效保存了用于杂交制种的纯雌系。目前研究发现, 植物乙烯合成途径的关键酶 ACC 合成酶和黄瓜雌性基因紧密连锁<sup>[19]</sup>, 而且乙烯受体基因在黄瓜雌性系中高度表达<sup>[20]</sup>。本研究用 300 mg/L AgNO<sub>3</sub> 在三叶一心期喷施纯雌系苦瓜, 花性别也成功实现了转雄分化, 不但花丝显著伸长, 而且花粉具有生活力; 同时利用 cDNA-AFLP 和反向 Northern 杂交等技术对处理花蕾中表达的差异基因进行了筛选和验证, 获得了 11 个与转雄相关的阳性基因片段, BLAST 比对后未发现与乙烯合成途径和受体相关的基因, 这可能和引物仅筛选了 128 对及主要挑选表达丰度强的条带分析有关。但我们筛选到一个属于细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 超大基因家族中 CYP72A 亚家族的一个成员 *McCYP72A1*, 其可能与 AgNO<sub>3</sub> 诱导纯雌系苦瓜产生了两性花而不是雄花有关。

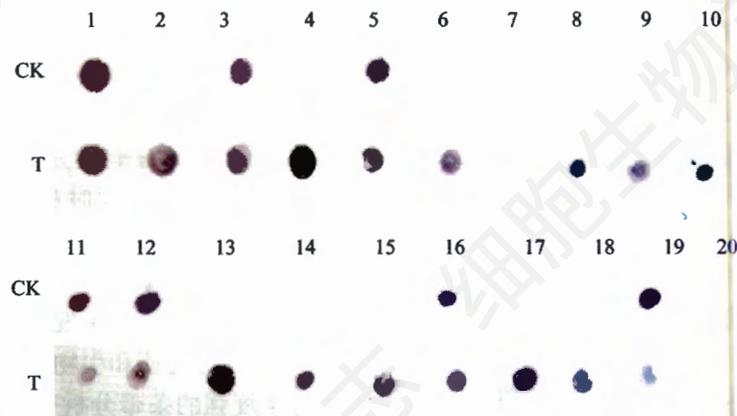


**Fig.1** Observations of stamen morphology (A) and its pollen activity (B, C) for bitter melon gynocious line flower induced into the male with  $\text{AgNO}_3$

CK: control; T: treatment.



**Fig.2** Electrophoresis diagrams of the extracted RNA (A), the synthesized cDNA (B), the cDNA-AFLP products amplified by selected primer combinations from the flower buds of bitter melon gynocious line (C) and the fragment of *McCYP72A1* amplified by primer combination of EPS2 and MPS3 which expressed in the flower buds treated with  $\text{AgNO}_3$  (D)  
M: PCR DNA Marker III; 1: control; 2: treatment. The former 4 lanes in (C) denote the products amplified by the primer combinations of EPS2 and MPS3, and the latter 4 lanes denote those of EPS3 and MPS5.



**Fig.3** Reverse-Northern hybridization analysis for positive verifications of the specific gene segments in flower buds of bitter melon gynocious line treated with  $\text{AgNO}_3$

1-20: the numbers of the related specific genes; CK: control; T: treatment.

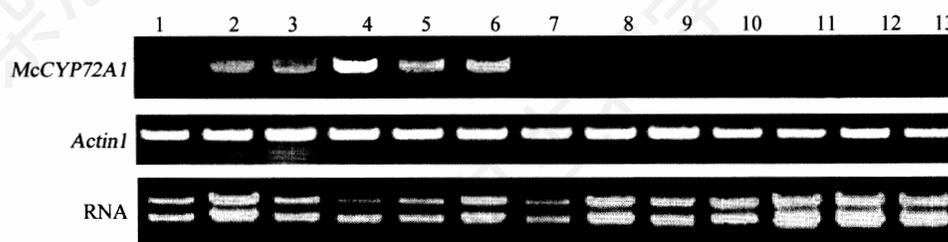


Fig.4 Analysis of the temporal and spatial expressions of *McCYP72A1* by RT-PCR

1-6: the flower buds of bitter melon gynoecious line treated with AgNO<sub>3</sub>; 7-9: the mixed samples of roots (7), stems (8), leaves (9) of the treatment at the aforesaid same times; 10-13: the mixed samples of buds (10), roots (11), stems (12), leaves (13) of the control.

Table 2 The aligned results of positive segments of differentially-expressed genes on line

Differential segment number	Length in size (bp)	Alignment result	The related physiological process
2	330	Unknown	Unknown
4	300	Plant CYP72A (cytochrome P450, 72family, A subfamily)	Sex differentiation
6	255	<i>Arabidopsis</i> brix domain-containing protein	Protein biosynthesis
8	225	<i>Arabidopsis</i> splicing factor 3A, subunit 3	RNA processing and modification
9	210	<i>Bacteroides coprocola</i> ATP-binding cassette transporter, ABC transporter	Material transportation
10	204	<i>Arabidopsis</i> N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, chloroplast precursor	Respiration metabolism related
13	156	<i>Nicotiana</i> related gene of cell death	Cell death
14	110	<i>Arabidopsis</i> chloroplast 50S ribosomal protein L33	Regulation of gene expression or gene control
15	200	<i>Arabidopsis</i> glycosyl hydrolase family 38 protein	Carbohydrates metabolism
17	245	Unknown	Unknown
18	346	<i>Nidula niveotomentosa</i> putative ATP synthase	Energy metabolism related

*CYP450* 是一个古老的基因超家族, 在植物生长发育过程中起着十分重要的作用, 其不但参与了油菜素内酯、赤霉素、脱落酸、黄酮类化合物和木质素等许多植物代谢物的合成<sup>[21]</sup>, 而且其中一些成员直接参与植物性别分化<sup>[22~24]</sup>, 同时 Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup> 等金属离子易诱导其表达<sup>[25]</sup>。*CYP72A* 功能主要是调节植物内源激素平衡, 此外也参与吲哚碱和油菜素内脂等激素的合成<sup>[21,26]</sup>。众所周之, 植物激素是性别分化的诱导信号, 激素对植物性别分化都有一定影响。另外, 我们在研究 AgNO<sub>3</sub> 诱导下的纯雌系苦瓜两性花分化与花蕾中内源激素的关系时也发现 AgNO<sub>3</sub> 处理后花蕾中内源激素表现为激素动态平衡的规律(另文发表)。由此推测, *CYP450* 基因家族成员 *McCYP72A1* 可能也在 AgNO<sub>3</sub> 诱导纯雌系苦瓜转雄过程起作用。RT-PCR 分析进一步证明 *McCYP72A1* 仅在 AgNO<sub>3</sub> 处理的纯雌系苦瓜花蕾中表达, 而在处理的根、茎、叶和对照的各个器官中均不表达。所以, *McCYP72A1* 是与 AgNO<sub>3</sub> 诱导纯雌系苦瓜花转雄相关的基因, 但是它是否是决定转雄的关键基因还有待证明。

## 参考文献(References)

- [1] 张炳桢, 彭艳丽, 李亮. 苦瓜的现代研究进展, *食品与药品*, 2006, 8(4): 26-30
- [2] 向亚林, 凌冰, 张茂新. 苦瓜化学成分和生物活性的研究进展, *天然产物研究与开发*, 2005, 17(2): 242-246
- [3] 郑岩松, 翟英芬, 黄红弟. 广东苦瓜育种研究现状及其发展方向, *广东农业科学*, 2008, (8): 44-47
- [4] Kaul MLH. *Male Sterility in Higher Plants*, New York: Springer-Verlag, 1988, 1-47
- [5] 刘定富. 植物显性核不育恢复性遗传的理论探讨, *遗传*, 1992, 14(6): 31-36
- [6] 汪俏梅, 曾广文, 蒋有条. 苦瓜性别表现研究概况及展望, *中国蔬菜*, 1995, (4): 50-53
- [7] Beyer EJ. Silver ion: a potent antiethylene agent in cucumber and tomato, *Hortscience*, 1976, 11(3): 195-196
- [8] 陈清华, 彭庆务, 卓齐勇, 等. 节瓜强雌系化学诱雄剂的筛选及利用研究, *广东农业科学*, 1999, (3): 26-29
- [9] 戚艺军, 程国旺, 王春生, 等. 西葫芦花发育特性及其化学改良措施, *安徽农业大学学报*, 2004, 31(4): 452-455
- [10] 李曙轩. 乙烯利及赤霉素对瓠瓜性别的影响, *植物生理学报*, 1981, 7(3): 265-271
- [11] 杨龔, 唐燕琼, Sakaoto M. AgNO<sub>3</sub>, GA<sub>3</sub> 和温度对苦瓜纯雌、雄株系性别分化的影响, *热带作物学报*, 2004, 25(3): 80-84
- [12] 崔辉梅, 曹家树, 张明龙, 等. 白菜和芜菁 *Ogura* 型雄性不育系与保持系的获得及其细胞学观察, *园艺学报*, 2004, 31

- (4): 467-471
- [13] 刘乐承, 曹家树. 白菜雄性不育相关基因 *BcMF4* 的反义 RNA 验证, *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2007, 33(4): 412-415
- [14] Bachem CWB, Heven RS, de Bruijn SM, *et al.* Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development, *Plant J*, 1996, 9(5): 745-753
- [15] 黄科, 余小林, 叶纨芝, 等. 芥蓝不定芽发生过程的基因表达差异分析, *细胞生物学杂志*, 2007, 29(1): 153-157
- [16] Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels, *Biotechniques*, 1994, 17(5): 914-921
- [17] Mo X, Zhu Q, Li X, *et al.* The *hpa1* mutant of a *Arabidopsis* reveals a crucial role of histidine homeostasis in root meristem maintenance, *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1425-1435
- [18] 汪俏梅, 曾广文. 苦瓜果性别分化的形态与组织化学研究, *浙江农业大学学报*, 1997, 23(2): 149-153
- [19] Kamachi S, Mizusawa H, Mazuura S, *et al.* Expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes, *CS-ACSL* and *CS-ASC2*, correlated with sex phenotypes in cucumis plants (*Cucumis sativus* L.), *Plant Biotechnol*, 2000, 17(1): 69-74
- [20] Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H. The ethylene-regulated expression of *CS-ETR2* and *CS-ERS* genes in cucumber plants and their possible involvement with sex expression in flowers, *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(5): 608-616
- [21] Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, *et al.* P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession number and nomenclature, *Pharmacogenetics*, 1996, 6(1): 1-42
- [22] Ye WZ, Cao JS, Xiang X, *et al.* Molecular cloning and characterization of the genic male sterility related gene *CYP86MF* in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. SSP. *chinensis* Makina var. *communis* Tsen et Lee), *J Hort Sci Biotechnol*, 2003, 78(3): 319-323
- [23] Yu XL, Cao JS, Dong DK. Measurement of some physiological and biochemical indexes of the antisense fragment of *CYP86MF* gene transgenic male sterile plantlets in Chinese cabbage-pak-choi, *Agric Sci China*, 2003, 2(11): 1239-1245
- [24] 王玲平, 曹家树, 叶纨芝, 等. 十字花科植物 *CYP86MF* 同源基因的克隆及特征分析, *农业生物技术学报*, 2005, 13(2): 145-151
- [25] Schuler MA. Plant cytochrome P450 monooxygenases, *Crit Rev Plant Sci*, 1996, 15(3): 235-284
- [26] Irmeler S, Schröder G, St-Pierre B, *et al.* Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 *CYP72A1* as secologanin synthase, *Plant J*, 2000, 24(6): 797-804

## Stamen Development and Gene Expression of Flower of Male-induced Bitter Melon Gynoecious Line

Ri-Sheng Wang<sup>1,2,3</sup>, Yang-Rui Li<sup>3\*</sup>, Sheng-Mao Zhou<sup>2</sup>, Man Zhang<sup>2</sup>, Feng-Xue Fang<sup>2</sup>, Li-Tao Yang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresources Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530005, China;

<sup>2</sup>Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

<sup>3</sup>Vegetable Research Center, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

**Abstract** To elucidate the differential gene expression during the development of stamens in female flower buds of bitter melon gynoecious line induced with AgNO<sub>3</sub>, in the present study, it was studied at the levels of morphology and transcription genomics using morphologic observations, cDNA-AFLP, RT-PCR and reverse-Northern hybridization. The results showed as follows: (1) After treated with AgNO<sub>3</sub>, stamens were generated at the 6th day, and bisexual flowers with viable pollen grains were observed at the 14th day, and gynoecious flowers were recovered since the 22th day. (2) Thirty-six primer combinations could amplify many distinct bands, among them, 11 bands which were strongly expressed only in the AgNO<sub>3</sub>-treated buds were cloned, sequenced and aligned on line, resulting in discovery of 2 unknown genes and 9 known genes. The sequence showing high similarity with *CYP450* gene super family which related to plant sex differentiation was named as *McCYP72A1*. (3) *McCYP72A1* was expressed in the flower buds during the period of 2–12 h after treated with AgNO<sub>3</sub>, and expressed most strongly at 8 h, but not expressed in the roots, stems, leaves of treatment and the mixed samples of buds, roots, stems, leaves of the control. It suggested that genes related to male differentiation in the flower buds of bitter melon gynoecious line were expressed after treated with AgNO<sub>3</sub>, which might make female flowers develop into bisexual flowers within 14 days.

**Key words** bitter melon; gynoecious line; male-induced treatment; cDNA-AFLP; differential gene expression

Received: January 14, 2009 Accepted: June 11, 2009

This work was supported by the National Key Technology R&D Pillar Program (No.2007BAD68B03), National Department Public Benefit Research Foundation (No.nyhyzx07-007-1), Guangxi Youth Foundation Program (No.0991077), Guangxi Natural Science Foundation Program (No.0728065) and the Foundation of Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab (No.0815011-6-1-14)

\*Corresponding author. Tel: 86-771-3247689, E-mail: liyr@gxaas.net