DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04123

白菜型油菜 *srb* 多室性状的遗传分析与分子鉴定

杨 阳** 李淮琳** 胡利民 范楚川* 周永明

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070

摘 要: 油菜多室角果是一种高产相关性状, 本研究对桑日白油菜(*srb*)多室性状的遗传调控机制进行研究。性状分析表明, 该突变体具有稳定的多室角果表型, 单株多室角果比例为 94.7%~100.0%, 每角果平均 3.5 个心皮。遗传上 *srb* 突变体中的多室性状受 1 对隐性核基因控制。比较测序分析发现, *srb* 中 *BrCLV3* 基因的 CLE motif 中存在一种新的单核苷酸突变(C/G), 可导致其保守结构域的第 12 位组氨酸突变为天冬氨酸, 将该位点命名为 *Brclv3_{Asp12}*。利用 SNP 标记进行分离群体的鉴定, 证实 *Brclv3_{Asp12}* 中的 C/G 单核苷酸变异与多室表型共分离。转基因互补测验和体外多肽的处理试验进一步证实, 该材料中控制多室性状位点 *Brclv3_{Asp12}* 突变导致了 CLV3 多肽活性的减弱, 是形成多室角果性状的原因。本研究初步阐明了白菜型油菜 *srb* 多室性状形成的机制。

关键词: 桑日白油菜; 多室角果; *BrCLV3*; 等位测验; 比较测序; 功能分析

Genetic analysis and molecular characterization of multilocular trait in the *srb* mutant of *Brassica rapa* L.

YANG Yang**, LI Huai-Lin**, HU Li-Min, FAN Chu-Chuan*, and ZHOU Yong-Ming

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: Multilocular silique is considered as a trait associated with high yield in rapeseed, and we studied the genetic regulation of the multilocular trait in *B. rapa* var. *srb*. This mutant showed a stable multilocular phenotype, ranging from 94.7% to 100% multilocular siliques per plant and 3.5 carpels per silique. Genetic analyses showed that the multilocular trait was monogenically governed by a recessive nuclear gene. Comparative sequencing analysis revealed that there was a novel C-to-G single-nucleotide mutation in the core CLE motif of *BrCLV3*, leading to histidine mutation at position 12 in conserved domain to aspartic acid, which was named *Brclv3_{Asp12}*. The analysis of segregated population by SNP marker showed that the C/G single-nucleotide variation in *Brclv3_{Asp12}* was co-segregated with the multilocular phenotype. Transgenic complementation studies and *in vitro* peptide assays further confirmed that the *Brclv3_{Asp12}* allelic mutation in *srb* could lead to reduced activity of the CLV3 peptide, resulting in the formation of multilocular phenotype. Therefore, the study preliminarily clarified the mechanism involved in multilocular silique formation in *srb* mutant.

Keywords: *B. rapa* var. *srb*; multilocular silique; *BrCLV3*; allelism test; comparative sequencing; functional analysis

油菜是我国重要的油料作物, 其角果一般由两心皮的雌蕊发育而来, 角果内被假隔膜分为两室, 种子着生于其中, 外被两片壳状果瓣。在自然界中也发现了多室油菜突变体, 其角果由多心皮雌蕊发育而成, 角果内被假隔膜分为 3~5 室, 外被 3~5 片壳状果瓣。这种自发突变体资源十分稀少, 其中白菜型油菜

(*Brassica rapa*, AA, $2n=20$)中主要有印度的黄籽沙逊多室油菜^[1]和中国西藏的桑日白油菜^[2]等 2 种多室材料; 在芥菜型油菜(*B. juncea*, AABB, $2n=36$)中有山西的三筒油菜、贵州的四轮油菜、青海的多室油菜和四川的四棱油菜等多室油菜^[3]。已有研究表明, 多室油菜相对于两室油菜主要具有两大优良特性: (1)多室

本研究由国家自然科学基金项目(31671279, 31971976, 31371240)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31671279, 31971976, 31371240).

* 通信作者(Corresponding author): 范楚川, E-mail: fanchuchuan@mail.hzau.edu.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 杨阳, E-mail: yangyangy91@163.com; 李淮琳, E-mail: 1228023730@qq.com

Received (收稿日期): 2020-06-05; Accepted (接受日期): 2020-09-13; Published online (网络出版日期): 2020-10-09.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201009.1313.002.html>

油菜具有较多的每角果粒数,可显著提高单株产量,在油菜的高产育种中具有应用潜力^[4-6]; (2)多室角果的抗裂角性较强,可用于抗裂角的研究和育种^[7]。因此,多室油菜作为一种新的种质资源,阐明其形成的遗传和分子机理,不仅可以丰富油菜花器官形态建成的理论,也有助于油菜高产新品种的培育。

遗传研究表明,白菜型油菜中的多室/两室相对性状受 1 对主效核基因的控制,两室性状对多室性状表现为完全显性,且无细胞质效应的影响^[1-2,4]。通过图位克隆的方法, Fan 等^[8]发现,拟南芥 *CLV3* (*CLAVATA3*)的同源基因调控黄籽沙逊 *ml4* 多室角果的形成;转基因互补测验和体外多肽的处理试验证明,该基因的 1 个单核苷酸突变(C/T)导致其 CLE motif 中第 9 位的脯氨酸突变成亮氨酸,引起 *CLV3* 多肽活性的丧失,最终导致了油菜多室角果的产生^[8]。在芥菜型油菜中,多室性状受 1 个隐性核基因^[5]或 2 个独立遗传的隐性核基因^[6,9]控制,同样两室对多室表现为完全显性,且无细胞质效应的影响。通过基因的精细定位, Xiao 等^[10]和 Xu 等^[11]分别将拟南芥 *CLV3* 多肽信号的受体 *CLV1* (*CLAVATA1*)的同源基因作为芥菜型油菜 A7 染色体上的多室候选基因。Xiao 等^[12]进一步证实, *BjuA07.CLV1* 基因编码区和启动子上的序列变异导致了芥菜型油菜多室的产生。在模式植物拟南芥中, *CLV* 信号途径调控了茎顶端分生组织内干细胞的分裂与分化之间动态平衡;当 *CLV3* 多肽信号或其受体发生突变时, *CLV* 信号的传递就会受到影响,从而导致顶端分生组织的干细胞数目增加、多心皮雌蕊和多室角果的产生^[13-14]。鉴于 *CLV* 信号途径在植物多室性状形成中的重要作用, Yang 等^[15]利用基因编辑技术对甘蓝型油菜中的 *CLV3*、*CLV1* 和 *CLV2* 等同源基因进行了突变,创建了具有稳定多室性状的突变体资源。由此表明, *CLV* 信号途径在不同类型油菜的多室角果形成过程中具有功能保守性。

来自西藏的桑日白油菜(简称 *srb*)是目前在我国发现的仅有的白菜型多室突变材料,与黄籽沙逊多室油菜具有完全不同的来源;该突变体的多室性状表现稳定,且受 1 对隐性基因控制^[2]。但至今仍然没有该材料中的多室基因精细定位和克隆的相关研究报道。因此,本研究对 *srb* 突变体的遗传进行了分析,并通过与 *ml4* 突变体的等位测验以及候选基因的验证,发现了该材料中存在的一种新的 *BrCLV3* 基因等位突变导致了多室角果的产生。该研究为进一步

深入解析 *BrCLV3* 基因参与油菜多室性状形成的分子机制提供了重要的材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其种植

所用的白菜型油菜包括两室黄籽沙逊(野生型,简称 WT)、多室黄籽沙逊 *ml4* 以及来自西藏的多室 *srb*。将 *srb* 分别与 WT 和 *ml4* 进行正反交得到 F₁, 然后自交产生 F₂ 分离群体,用于 *srb* 多室性状的遗传分析。所有材料于 2017 年 9 月在华中农业大学油菜玻璃温室进行盆栽种植,花盆直径 25 cm,每盆定苗 4 株,参照正常方法管理温室,翌年 1 月至 2 月份调查花器官数目和角果心皮数目变异。拟南芥突变体 *clv3-2* 和野生型 *Landsberg erecta* (*ler*)购自美国 *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC)。在昼/夜 16 h/8 h、22 /18 、光照强度 115~144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的培养室内生长。

1.2 *BrCLV3* 等位基因的比较测序

在白菜型油菜中仅存在 1 个 *CLV3* 的同源拷贝,即位于 A4 染色体上的 *BrCLV3* (*Bra034340*)。针对该基因的不同区域共设计了 3 对 PCR 引物进行扩增,其中 DXP118/DXP120 扩增 2260 bp 的启动子区域, DXP117/DXP121 扩增基因编码区, DXP125/DXP136 扩增 2541 bp 的 3'下游区。具体引物序列见表 1。扩增产物连入 pMD18-T 载体上,每个扩增片段挑选 4~5 个阳性克隆采用载体通用引物测序;使用 Sequencher 3.1.2 软件比对分析测序结果。

表 1 本研究中所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence (5'-3')
18S rRNA F	AGGCCCGGGTAATCTTTG
18S rRNA R	TCAACGCGAGCTGATGAC
DXP109	AAGGAGGTTTAAGGGATATGAGA
DXP113	TTAATTAAGGAGGTTTAAGGGATATGAGA
DXP114	GGCGCGCTACAAAATGGATTCGAGGACTC
DXP117	TTAATTAACACGGGATGTTTAGAACACGGGA
DXP118	GTTGTTCTTTACTCTGGTAATGAGATAGGA
DXP120	TGTGACGCTTTAGGTAGTAGGCAG
DXP121	TACCAACGTCTTCATCGCCCAACT
DXP125	GCAAAGTGGTGACGTGAGCGAAAT
DXP129	GGGAGGAGCAAATGGAATTGAAG
DXP136	CCATGGATCTATTAGGTACCCCAT
DXP246	AGGACCTGACCCTTTGCTCG
DXP247	CAGGACCTGACCCTTTGCATC
DXP248	AGGCTGCGAATTGTTGAATTTT

1.3 SNP 分子标记开发与基因型分析

利用 SNAPER 程序^[15], 针对 *Brclv3_{Asp12}* 中的 C/G 单核苷酸变异开发特异性的 SNP 标记, 其中引物对 DXP246/249 和 DXP248/DXP249 分别特异性扩增 *Brclv3_{Asp12}* 和 *BrCLV3* 等位基因。扩增产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。引物序列见表 1。SNP 标记的 PCR 扩增体系含 50 ng μL^{-1} 的模板 DNA 2.0 μL 、10×PCR buffer 1.0 μL 、2 mmol L^{-1} dNTPs 0.8 μL 、10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 引物各 0.15 μL 、2 U μL^{-1} *Taq* DNA 聚合酶 0.15 μL , 添加 ddH₂O 至 10 μL 。PCR 扩增程序为 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s, 59 退火 30 s, 72 延伸 30 s, 扩增 34 个循环; 最后 72 延伸 10 min。

1.4 *Brclv3_{Asp12}* 的超量表达载体构建与遗传转化

设计分别带有 *Pac* I 和 *Asc* I 酶切接头的引物对 DXP113/DXP114, 从 *srb* 突变体的 cDNA 中克隆 *Brclv3_{Asp12}* 等位基因, 通过酶切连接方法连入 pMDC83 质粒载体的 35S 启动子后面, 获得 35S::*Brclv3_{Asp12}* 超量表达载体。引物序列见表 1。载体质粒转化农杆菌菌株 GV3101 后通过蘸花法转化拟南芥 *clv3-2* 突变体。收获的种子播种到含有潮霉素抗性的 0.5×MS 培养基上筛选转基因阳性植株。

1.5 石蜡切片的制作与显微观察

选取花蕾进行石蜡切片的制作, 具体操作程序见 Fan 等^[8]的方法。采用 Nikon eclipse 80i 显微镜(日本)观察切片并照相。

1.6 多肽的合成与体外处理

分别合成野生型多肽 BrCLV3 (RTVPSGPDPLHH)和突变型多肽 *Brclv3_{Asp12}* (RTVPSGPDPLHD), 纯度 > 95% (金斯瑞, 中国南京)。用超纯水溶解成 1 mmol L^{-1} 母液后过滤消毒, 保存于 -20 °C 冰箱中备用。将表面消毒的拟南芥种子在添加多肽的液体和固体培养基上培养, 分别观察多肽对茎顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM)和主根生长的影响。具体操作程序见 Fan 等^[8]的方法。每种处理至少设置 3 次生物学重复。

1.7 RNA 抽提和基因表达分析

抽提拟南芥生长 20 d 的叶片 RNA 进行 RT-PCR 的基因表达量检测。RNA 抽提、反转录和 RT-PCR 等程序详见 Fan 等^[8]的方法。*BrCLV3* 和内参基因 18S *rRNA* 的表达检测引物对分别为 DXP109/DXP129 和 18S *rRNA* F/R, 序列详见表 1。

2 结果与分析

2.1 多室白菜型油菜 *srb* 的角果形态分析

对多室白菜型油菜 *srb* 的花器官和角果变异进行观察和分析发现, 其花器官数目变异与多室黄籽沙逊 *ml4* 类似, 即: 花萼和花瓣等花器官数目正常; 雄蕊数目基本正常, 但在极少数花中可以观察到 7 个(图 1-a~j); 雌蕊相对于 WT 明显增粗。*srb* 的角果多室性状遗传稳定, 单株多室角果比例 94.7%~100.0%, 平均为 97.9%, 每角果具有 3~4 个心皮(平均 3.5 个心皮)。多室角果平均长、宽和厚分别为 37.0、6.4 和 3.8 mm; 较两室角果显得短而粗。

对子房进行石蜡切片观察, WT 材料的子房为两室, 是由 2 个心皮相对发育成一个完整的假隔膜, 将心皮分割成 2 个腔室, 假隔膜两侧分别着生 1 列种子; *srb* 的三室子房则由 3 个心皮向中间发育形成“Y”字型假隔膜, 将角果分割成 3 个腔室, 假隔膜上着生 3 列种子, 果皮分为 3 瓣(图 1-x); 在 *srb* 和 *ml4* 的四心皮子房内, 2 个近乎平行排列的假隔膜将子房腔分隔成 3 个腔室, 中间的腔室比两侧的腔室大, 中间的腔室着生 2 排胚珠, 而两侧的腔室各着生 1 排胚珠, 其假隔膜的横切面呈“II”型(图 1-y)。

2.2 白菜型油菜 *srb* 多室性状的遗传分析

为确定 *srb* 中多室性状的遗传规律, 将其与两室白菜型油菜 WT 进行正反交, F₁ 单株全部表现为两室, 表明 *srb* 中的多室性状由隐性核基因控制, 且无细胞质效应(表 2)。在 F₂ 分离群体中, 两室表型单株(78 株)与多室表型单株(23 株)符合 3 : 1 的分离比 ($\chi^2=0.27$, $P>0.05$)。表明 *srb* 中的多室性状受 1 对隐性核基因控制。

为确定 *srb* 中的多室基因是否与我们前期克隆的多室基因 *Brclv3* 相同, 进一步将 *srb* 与 *ml4* 进行等位测验发现, 它们的正反交 F₁ 和 F₂ 分离群体的所有单株全部表现为多室(表 2)。表明 *srb* 中的多室基因与 *ml4* 中的多室基因等位, 因此它们的多室性状可能均由 *BrCLV3* 基因的突变所导致。

2.3 白菜型油菜 *srb* 中多室候选基因 *BrCLV3* 的克隆与序列分析

我们对 *srb* 中的 *BrCLV3* 等位基因的编码区、2.3 kb 的启动子区和 2.5 kb 的 3'端侧翼序列进行比较测序。与 WT 中的 *BrCLV3* 序列比对分析, 共发现 3 处碱基序列变异(图 2-a)。其中, 位于 3'端的 SNP 差异和第 2 个内含子中 ATAT 插入/缺失差异都不会

图 1 多室白菜型油菜的花器官和角果表型观察
Fig. 1 Phenotypic observation of floral and silique morphology of multilocular *B. rapa*
a~b、c~f、g~j 分别代表 WT、多室 *ml4* 和 *srb* 的花器官数目比较; k~l、m~p、q~v 分别代表 WT、*ml4* 和 *srb* 的角果及其横切面显示心皮数目变异; 横切石蜡切片显示在花发育第 9~11 时期的 WT (两心皮, w)、*ml4* (3~4 心皮, x~y) 和 *srb* (2~4 心皮, w~y) 的雌蕊心皮变异; lc: locule; O: ovule; M: medial region; L: lateral region; 标尺为 2 mm (k, m, o, q, s, u)、0.5 mm (l, o, p, r, t, v) 和 100 μ m (w~y)。
a~b, c~f, g~j represent the number of floral organs in WT, *ml4* and *srb*, respectively; k~l, m~p, q~v represent siliques with different carpel numbers in WT, *ml4* and *srb*, respectively; cross-sections of gynoecia of WT (two carpels, w), *ml4* (3~4 carpels, x~y) and *srb* (2~4 carpels, w to y) at stage 9~11; lc: locule; O: ovule; M: medial region; L: lateral region. Bar = 2 mm (k, m, o, q, s, u), 0.5 mm (l, o, p, r, t, v), and 100 μ m (w~y).

表 2 亲本和 F₁ 材料的多室角果比例
Table 2 Performance of multilocular silique trait in parents and F₁ hybrids

材料 Material	范围 Range (%)	均值±标准差 Mean±SD (%)
<i>ml4</i> mutant	79.6~100.0	97.90±5.10
<i>srb</i> mutant	96.0~100.0	96.40±0.03
WT	0	—
<i>ml4</i> * <i>srb</i> F ₁	100.0	—
<i>srb</i> * <i>ml4</i> F ₁	100.0	—
WT* <i>srb</i> F ₁	0	—
<i>srb</i> *WT F ₁	0	—

引起该基因蛋白序列的改变, 而位于第 3 个外显子中的 C/G 单核苷酸突变可导致编码蛋白的 1 个氨基酸替换。进一步比较 *ml4*、*srb* 和 *Chiifu-401* (已发表基因组序列的白菜, 两室表型) 之间的氨基酸序列差异发现, 该突变氨基酸位于 CLE motif 的第 12 位, 由组氨酸突变成天冬氨酸, 将其命名为 *Brclv3_{Asp12}*; 它与前期在 *ml4* 中发现的 CLE motif 上的碱基变异不同, 因此 *Brclv3_{Asp12}* 是一个新的等位突变, 可引起

CLV3 多肽信号的序列突变(图 2-b)。在拟南芥中, CLE motif 是 *CLV3* 多肽信号分子的重要功能域, 由 12 个保守的氨基酸组成, 其中第 12 位组氨酸对于维持茎顶端分生组织的大小至关重要^[16-17]。因此, 本研究新发现的第 12 位 His-to-Asp 氨基酸替换可能影响 *BrCLV3* 基因的正常功能发挥, 从而影响角果的正常发育。

2.4 *Brclv3_{Asp12}* 等位基因特异的 SNP 标记在分离群体中的表型共分离验证

针对 *Brclv3_{Asp12}* 中的 C/G 单核苷酸变异开发了特异性的 SNP 标记, 并对 *srb* × WT 杂交产生的 F₂ 分离群体进行了 *BrCLV3* 基因型的鉴定。结果表明, *BrCLV3* 纯合基因型(AA)单株都为两室角果表型, *Brclv3_{Asp12}* 纯合基因型单株(aa)都为多室角果表型, 杂合基因型单株(Aa)表现为两室或近乎两室角果表型(图 3); 3 种基因型单株的比例(AA Aa aa)符合 1 2 1 的分离比($\chi^2=0.80$, $P>0.05$)。该结果证实 *Brclv3_{Asp12}* 中的 C/G 变异与多室表型共分离, 表明该 SNP 变异可能是引起 *srb* 中多室角果产生的原因。

图 2 *BrCLV3* 基因结构和氨基酸序列比对

Fig. 2 *BrCLV3* gene structure and amino acid sequences alignment

a: *BrCLV3* 基因结构以及突变体 *srb* 与野生型材料间的碱基变异；黑色方框表示编码区；序列比较可以发现 *srb* 与野生型间存在 2 个单核苷酸突变和 1 个 ATAT 的插入/缺失突变。b: 白菜型油菜及拟南芥中 *CLV3* 同源基因的氨基酸序列比对；箭头为 *CLV3* 信号肽序列剪切位点，下划线为 C 端保守结构域 CLE motif，红色标识突变的氨基酸。

a: *BrCLV3* gene structure and natural variations between the alleles from WT and *srb*; black boxes represents the coding regions; there are two single nucleotide substitutions and one ATAT insertion/deletion in *BrCLV3* gene regions between WT and *srb*. b: alignment of the amino acid sequences of *CLV3* from *B. rapa* (*srb*, WT, *ml4*, *Chifu-401*, and *Arabidopsis*); the putative signal sequence cleavage site is indicated by arrow, the conserved domain (CLE motif) at its C-terminus is underlined, and the amino acid changes in *srb* and *ml4* are highlighted by the red highlighted font.

图 3 利用 *Brclv3_{Asp12}* 等位基因特异性 SNP 标记对 *srb**WT 的 F_2 群体进行基因型和多室表型的共分离检测

Fig. 3 Co-segregation analysis of genotype and multilocular phenotype in *srb**WT F_2 population by *Brclv3_{Asp12}* allele-specific SNP marker

2.5 白菜型油菜 *srb* 多室候选基因的转基因功能互补验证

构建 *Brclv3_{Asp12}* 等位基因的超量表达载体并转化拟南芥 *clv3-2* 突变体。获得的大部分转基因株系仍都表现为 *clv3-2* 的突变表型，包括茎扁平、花序茎顶端分生组织显著增大和角果全部为多室等(图 4-i~n)。本研究也发现，5 个独立的转化家系都能够部分恢复 *clv3-2* 突变体的表型，包括部分角果表现为两室(图 4-c, d)和较为正常的花序顶端分生组织(图 4-o, p)；未发现能够完全恢复 *clv3-2* 突变表型的转基因植株。在这些部分恢复的转基因家系中 *BrCLV3* 基因表达量较 *clv3-2* 都显著增加(图 4-s)。统计分析表明，它们的心皮数都较 *clv3-2* 显著减少，但是都未能恢复到野生型的水平(图 4-t)。表明 *Brclv3_{Asp12}* 等位基因与已报道的 *BrCLV3* 功能类似，仍然具有参与茎顶端分生组织大小及多室角果发育调控的作用，只是功能有所减弱。因此 *Brclv3_{Asp12}* 中的组氨酸/天冬氨酸突变可以引起 *BrCLV3* 等位基因的部分功能丧失，从而导致多室角果的产生。

2.6 白菜型油菜 *srb* 中多室候选基因的体外多肽处理验证

为了进一步明确 *srb* 中 *Brclv3_{Asp12}* 等位基因变异对其产物的活性影响，本研究针对 CLE motif 序列合成了野生型多肽 BrCLV3 和突变型多肽 Brclv3_{Asp12}，并对拟南芥 *clv3-2* 突变体和野生型 *Ler* 进行了体外处理。

在液体培养条件下，对拟南芥幼苗的 SAM 大小进行了测量。经野生型多肽 BrCLV3 处理后，拟南芥 *clv3-2* 突变体的 SAM 面积显著减小(图 5-b, d, e)，与野生型 *Ler* 对照在未处理时的 SAM 面积无显著差异(图 5-a, d, e)；表明 BrCLV3 多肽具有抑制茎顶端分生组织生长的活性，通过添加外源 BrCLV3 多肽可以将 *clv3-2* 突变体中增大的 SAM 恢复到野生型的状态。在 Brclv3_{Asp12} 多肽处理条件下，*clv3-2* 突变体的 SAM 面积也显著减小，但仍极显著大于 BrCLV3 多肽处理下的 *clv3-2* 突变体以及未处理的野生型 *Ler* (图 5-a~e)；表明 *Brclv3_{Asp12}* 中的组氨酸/天冬氨酸突变可以引起 CLV3 多肽活性的部分丧失，使其不能正常调控茎顶端分生组织的生长。

图 4 转化 $35S::Brclv3_{Asp12}$ 可以部分恢复拟南芥 $clv3-2$ 多室突变表型

Fig. 4 Phenotypes of $35S::Brclv3_{Asp12}$ transgenic plants in the $clv3-2$ background

野生型拟南芥 *ler* 为两室角果(a, b)和正常花序(q, r), $clv3-2$ 突变体的角果主要为 5~6 室(i~l)和异常增大的花序顶端分生组织(m, n), $35S::Brclv3_{Asp12}$ 转化 $clv3-2$ 突变体产生了部分表型恢复单株, 其角果为 2~6 室(c~l)和较为正常花序(o, p)。部分恢复转基因家系中 $BrCLV3$ 转录水平的 RT-PCR 检测(s)以及单株角果心皮数统计分析(t)。小写字母表示在 0.05 水平下差异显著。标尺为 0.5 mm。

The phenotypes of bilocular siliques (a, b) and normal inflorescence (q, r) in *ler*, multilocular siliques with 5~6 locular (i~l) and enlarged inflorescence (m, n) in $clv3-2$, and $35S::Brclv3_{Asp12}$ transgenic plants with partly rescue phenotypes, including 2~6 carpels (c~l) and normal inflorescence (o, p). Gene expression (s) and phenotype analysis of carpel numbers per plant (t) in five independent $35S::Brclv3_{Asp12}$ transgenic lines, which showed partially rescued phenotypes; the data and error bars represent the mean $\pm$ SD ($n \geq 15$ plants for each line). Bars superscripted by lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 probability level. Bar = 0.5 mm.

前期研究表明, 野生型多肽 $BrCLV3$ 也能显著抑制根系生长^[8]。因此, 我们在固体培养基上检测了不同多肽处理浓度条件对拟南芥的根长及根顶端分生组织(root apical meristem, RAM)生长的影响。在 1 nmol L^{-1} $BrCLV3$ 多肽或 $Brclv3_{Asp12}$ 多肽处理条件下, 拟南芥的主根长或 RAM 大小相对于未添加多肽的对照处理无显著差异(图 6-a~c, h~j, o, p)。在 10 nmol L^{-1} 多肽处理条件下, $Brclv3_{Asp12}$ 多肽处理条件下的拟南芥主根长或 RAM 大小与未添加多肽的对照处理间无显著差异(图 6-a, d, h, k, q, r); 但是 $BrCLV3$ 多肽处理会显著抑制拟南芥主根或 RAM 生长(图 6-a, e, h, l, q, r)。在 100 nmol L^{-1} 多肽处理条件下, $BrCLV3$ 和 $Brclv3_{Asp12}$ 多肽处理均会极显著抑制拟南芥主根或

RAM 生长(图 6-f, g, m, n, s, t)。该结果进一步证实 *srb* 中的 $Brclv3_{Asp12}$ 具有较低的多肽活性。

3 讨论

很多研究已经证明白菜型油菜的多室性状受 1 对隐性核基因控制^[1-2,4]。在前期研究中, 我们首次成功图位克隆了白菜型黄籽沙逊 *ml4* 中的多室基因; 发现 *Brclv3* 基因第 3 个外显子中的 1 个单核苷酸突变(C/T)导致其 CLE motif 中第 9 位的脯氨酸的突变, 从而导致其产生多室表型^[8]。在本研究中, 遗传分析发现, *srb* 中的多室性状同样受 1 对隐性核基因控制, 这与前人的结果一致^[2]; 进一步的等位测验发现, *srb* 中的多室基因与 *ml4* 中的相同(表 2)。比较测序

图 5 不同多肽处理对拟南芥 SAM 大小的影响

Fig. 5 Effects of different peptides on the SAMs in *Arabidopsis*

1: 未添加多肽(a, b)、添加 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ BrCLV3_{ASP12} 多肽(c)和 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ BrCLV3 多肽(d)处理下的野生型 *ler* (a)和突变体 *clv3-2* (b, c, d) 生长 9 d 的 SAM 观察; SAM 相对大小是通过测量 SAM 侧平面上 2 个对生叶原基(箭头指示处)以上的面积; 标尺为 $50 \mu\text{m}$ 。2: 不同多肽处理 9 d 后拟南芥 SAM 大小比较(e), 每种处理至少统计 20 个单株; 大写字母表示 0.01 水平下差异显著。

1: *ler* (a) and *clv3-2* (b, c, d) plants were grown on 1/2 MS liquid media (a, b) containing $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ BrCLV3_{ASP12} peptide (c) and $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ BrCLV3 peptide (d), and 9-day-old *Arabidopsis* seedlings were observed; the area of the SAM was measured on a median plane by calculating the area above the straight line from the upper edges of two opposite leaf primordia (arrowheads); Bar = $50 \mu\text{m}$. 2: area of the SAM after different peptide treatments for nine days (e), the data and error bars represent the mean $\pm$ SD ($n \geq 20$ plants for each line). Bars superscripted by lowercase letters indicate significant differences at the 0.01 probability level.

图 6 不同多肽处理对野生型拟南芥主根和 RAM 的影响

Fig. 6 Effects of different peptides on the root and RAM in *Arabidopsis*

未添加多肽(a, h)和分别添加 1 nmol L^{-1} (b, c, i, j, o, r)、 10 nmol L^{-1} (d, e, k, l, p, s)、 100 nmol L^{-1} (f, g, m, n, q, t)浓度的突变型多肽 BrCLV3_{ASP12} (b, d, f, i, k, m)和野生型多肽 BrCLV3 (c, e, g, j, l, n)处理 8 d 对拟南芥 *ler* 的主根生长的抑制作用。每种处理至少统计 26 个单株, **表示 0.01 水平下差异显著。a~g 中标尺为 1 cm, h~n 为 $100 \mu\text{m}$ 。黑色箭头指示根分生组织和伸长区的边界。

Arabidopsis seedlings of 8-day-old were grown on agar media without (a, h) or with 1 nmol L^{-1} (b, c, i, j, o, r), 10 nmol L^{-1} (d, e, k, l, p, s), 100 nmol L^{-1} (f, g, m, n, q, t) of the BrCLV3_{ASP12} (b, d, f, i, k, m) or BrCLV3 (c, e, g, j, l, n) peptides, respectively. The data and error bars represent the mean $\pm$ SD ($n \geq 26$ plants for each line). ** indicates significant difference at the 0.01 probability level. Bar = 1 cm (a~g). Bar = $100 \mu\text{m}$ (h~n). The black arrows indicate the border between the root meristematic and elongation zones.

分析发现, *srb* 的 CLE motif 中存在一种新的单核苷酸突变(C/G), 可导致该保守结构域的第 12 位组氨酸突变为天冬氨酸(图 2)。进一步通过拟南芥中的遗传转化试验和体外多肽处理试验证实, 该单核苷酸突变可以引起 *BrCLV3* 基因功能的部分丧失, 并引起多室角果的产生(图 4~图 6)。

大量研究表明, 拟南芥 *CLV3* 基因编码的蛋白经过对 CLE motif 的剪切和修饰, 最终形成包含 12~13 个氨基酸的多肽信号来行使其所有功能^[19-20]。已有的研究表明, CLE motif 中每一位氨基酸对 *CLV3* 多肽功能的重要性有所不同。为了评估它们的贡献大小, Kondo 等^[17]通过氨基酸替换和体外多肽处理相结合的方法进行研究, R1、P9、H11 和 H12 依次是影响 *CLV3* 功能最重要的 4 个氨基酸, 而 T2、S5、P7 和 L10 等 4 个氨基酸的重要性最低。通过体外 *CLV3* 多肽信号与其受体进行竞争性结合的试验表明, R1、H12、G6、P4 和 V3 等 5 个氨基酸是影响 *CLV3* 信号与 *CLV1* 胞外受体结合最重要的氨基酸^[17]。为了在植物体内更为准确地评价每个氨基酸的作用大小, Song 等^[18]对 *CLV3* 多肽进行丙氨酸的替换和拟南芥 *clv3-2* 突变体互补转化试验发现, 在 *CLV3* 调控 SAM 稳态过程中, D8、H11、G6、P4、R1 和 P9 等 6 位氨基酸的作用最为重要, 其次为 H12 和 L10, 而 T2、V3、S5 和 P7 等氨基酸的作用并不重要。在这些研究中, P9 对 *CLV3* 多肽都表现出重要的贡献。因此, 当白菜型油菜 *BrCLV3* 基因中的第 9 位脯氨酸发生自然突变时, 会导致该基因功能的丧失, 并引起多室角果的产生^[8]。H12 对 *CLV3* 多肽的功能也十分重要, 但重要性相对 P9 较弱^[17-18]。因此, 不难理解在本研究中新发现的 *Brclv3_{Asp12}* 等位突变仅能引起 *CLV3* 多肽活性的部分丧失(图 4~图 6)。由于 H12 是参与 *CLV3* 多肽信号与其受体结合的重要氨基酸^[17], 我们推测 *srb* 中 *BrCLV3* 基因脯氨酸到天冬氨酸的突变可能主要通过减弱 *CLV3* 多肽信号与受体结合的能力而降低了其活性。该结论还需要进一步的研究证据去证实。

4 结论

来自我国西藏的白菜型油菜 *srb* 具有稳定的多室角果表型, 该性状受 1 对隐性核基因控制, 且与黄籽沙逊 *ml4* 中的多室基因等位。比较测序分析发现, *srb* 中 *BrCLV3* 基因的 CLE motif 中存在一种新的单核苷酸突变, 可导致该保守结构域的第 12 位组氨酸

突变为天冬氨酸。针对该 SNP 开发的 *Brclv3_{Asp12}* 等位基因特异标记在分离群体中与多室表型共分离表明, 该 SNP 变异可能是引起 *srb* 油菜产生多室角果的原因。通过转基因互补测验和体外多肽的处理试验都证明, *Brclv3_{Asp12}* 等位突变可以导致 *CLV3* 多肽活性的减弱。因此, 本研究推测 H12 是参与白菜型油菜中 *CLV3* 多肽信号与其受体结合的重要氨基酸。

References

- [1] Mohammad A, Irka S, Aziz M. Inheritance of seed colour in some *Brassica oleiferous*. *Indian J Genet Plant Breed*, 1942, 2: 112-127.
- [2] 何余堂, 龙卫华, 胡进平, 傅廷栋, 李殿荣, 陈宝元, 涂金星. 白菜型油菜角果多室性状的遗传及解剖学研究. *中国油料作物学报*, 2003, 25: 1-4.
He Y T, Long W H, Hu J P, Fu T D, Li D R, Chen B Y, Tu J X. Anatomic and genetic studies on multicapsular character in *Brassica campestris* L. *Chin J Oil Crop Sci*, 2003, 25: 1-4 (in Chinese with English abstract).
- [3] 刘后利. 油菜的遗传育种学. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. p 162.
Liu H L. Genetics and Breeding of *Brassica napus*. Beijing: China Agricultural University Press, 2000. p 162 (in Chinese).
- [4] Varshney S. Inheritance of silique characters in Indian colza: I. Locule number and silique position. *Euphytica*, 1987, 36: 541-544.
- [5] 赵洪朝. 芥菜型油菜多室性状的遗传表现及其与甘蓝型油菜的种间远缘杂交. 西北农林科技大学硕士学位论文, 陕西杨凌, 2003.
Zhao H C. Study on Multilocular Heredity of *Brassica juncea* and Interspecific Hybridization between *B. juncea* and *B. napus*. MS Thesis of Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China, 2003 (in Chinese with English abstract).
- [6] 吕泽文. 芥菜型油菜多室性状的遗传分析及其基因的分子标记. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2011.
Lyu Z W. Study on Inheritance and Molecular Markers for Multilocular Trait in *Brassica juncea*. MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [7] Kadkol G P, Halloran G M. Inheritance of silique strength in *Brassica campestris* L.: I. Studies of F₂ and backcross populations. *Can J Gene Cytol*, 1986, 28: 365-373.
- [8] Fan C C, Wu Y D, Yang Q Y, Yang Y, Meng Q W, Zhang K Q, Li J G, Wang J F, Zhou Y M. A novel single-nucleotide mutation in a *CLAVATA3* gene homologue controls a multilocular silique trait in *Brassica rapa* L. *Mol Plant*, 2014, 7: 1788-1792.
- [9] Choudhary B, Solanki Z. Inheritance of silique locule number and seed coat colour in *Brassica juncea*. *Plant Breed*, 2007, 126: 104-106.
- [10] Xiao L, Zhao H Y, Zhao Z, Du D Z, Xu L, Yao Y M, Zhao Z G, Xing X R, Shang G X, Zhao H C. Genetic and physical fine mapping of a multilocular gene *Bjln1* in *Brassica juncea* to a 208-kb

- region. *Mol Breed*, 2013, 32: 373–383.
- [11] Xu P, Lyu Z W, Zhang X X, Wang X H, Pu Y Y, Wang H M, Yi B, Wen J, Ma C Z, Tu J X, Fu T D, Shen J X. Identification of molecular markers linked to trilocular gene (*mc1*) in *Brassica juncea* L. *Mol Breed*, 2014, 33: 425–434.
- [12] Xiao L, Li X, Liu F, Zhao Z, Xu L, Chen C P, Wang Y H, Shang G X, Du D Z. Mutations in the CDS and promoter of *BjuA07.CLV1* cause a multilocular trait in *Brassica juncea*. *Sci Rep*, 2018, 8: 5339.
- [13] Brand U, Fletcher J C, Hobe M, Meyerowitz E M, Simon R. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*, 2000, 289: 617–619.
- [14] Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer K F, Jürgens G, Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 2000, 100: 635–644.
- [15] Yang Y, Zhu K Y, Li H L, Han S Q, Meng Q W, Khan S U, Fan C C, Xie K B, Zhou Y M. Precise editing of *CLAVATA* genes in *Brassica napus* L. regulates multilocular silique development. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 1322–1335.
- [16] Drenkard E, Richter B, Rozen S, Stutius L M, Angell N A, Mindrinos M, Cho R J, Oefner P J, Davis R W, Ausubel F M. A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1483–1492.
- [17] Kondo T, Nakamura T, Yokomine K, Sakagami Y. Dual assay for MCLV3 activity reveals structure-activity relationship of CLE peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377: 312–316.
- [18] Song X F, Yu D L, Xu T T, Ren S C, Guo P, Liu C M. Contributions of individual amino acid residues to the endogenous CLV3 function in shoot apical meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2012, 5: 515–523.
- [19] Fiers M, Golemiec E, van der Schors R, van der Geest L, Li K W, Stiekema W J, Liu C M. The *CLV3/ESR* motif of *CLV3* is functionally independent from the nonconserved flanking sequences. *Plant Physiol*, 2006, 141: 1284–1292.
- [20] Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, Mizuno S, Kakimoto T, Fukuda H, Sakagami Y. A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science*, 2006, 313: 845–848.