

大麦的闭颖开花特性源于 micro RNA介导的HvAP2基因的 剪切抑制

Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided *HvAP2* mRNA cleavage—Sudha K. Naira, Ning Wang 等16位作者。490–495 | PNAS | January 5, 2010, vol. 107, no. 1。

摘要

完全自花授粉植物通常具有闭颖授粉的特性，即在开花之前就散粉了。闭颖授粉的谷类作物不仅降低了其因自然异交而导致的基因流动，而且还提供了一条躲避赤霉病感染的途径。

摘要

闭颖授粉大麦的浆片是萎缩的。通过图位克隆分离出了闭颖授粉基因 *cleistogamy 1 (Cly1)*。该基因编码一个转录因子，包含两个 AP2 结构域和一个 miR172 的作用位点，与拟南芥 AP2 基因同源。

摘要

Cly1表达集中在大麦的浆片原基。关联分析表明，闭颖开花性状的产生，是由于在miR172的作用位点发生了单碱基同义代换。miR172介导的mRNA剪切仅在开颖的基因型中检测到。

摘要

虽然由于在miR172作用位点发生单碱基改变，使浆片不能正常发育，从而导致闭颖授粉，但是作者认为，大麦开颖性状的产生是由于miR172诱导的*Cly1*基因的下调节，促进了大麦浆片的发育所致。

引言

化石记录表明，被子植物大约出现在1亿3千万年前，自那时以来植物的传粉方式开始发生了分化。尽管有些物种的花粉是通过风或水来传播，但是更多的是利用昆虫来传播的。

引言

雌雄同体的被子植物的花是由心皮和外围的雄蕊组成。在禾本科植物中，心皮和雄蕊的基部生长发育出一个小的膨胀结构——称为浆片。

引言

当小花开放时，内外稃（包裹小花的1对苞片）由于浆片的膨胀而被迫分离，然后花丝迅速伸长，花药外露，随即花药破裂，花粉释放。与此相应柱头也跟着突出，只是时间上稍晚一些。

引言

尽管小麦和大麦多数是在花药外露之后散粉，但是大部分为自花授粉；这是因为它们的柱头在花药外露之前已经处在接受状态，无需借助风媒即可捕获到足够量的自身花粉。有些野生大麦，花药外露非常突出，其异交率明显高于栽培大麦。

引言

异花授粉能够维持群体中的遗传变异。自花授粉则不必依赖任何不可靠的传粉媒介，是一种适应，常见于人类驯化物种，对于这些植物来讲，成功的进行繁殖和保持后代的遗传一致性更为有利。

引言

大麦中存在一种自然变异，散粉阶段内外稃始终保持紧闭，称为闭颖授粉。闭颖大麦的浆片要比开颖大麦的小很多。大麦的闭颖授粉性状属单基因隐性遗传，由 *cly1* 控制，位于2H染色体长臂上。

引言

研究目的:

分离 *Cly1* 基因，揭示有关开颖特性的分子机制，探讨该基因在栽培大麦驯化过程中的贡献。

材料和方法

□ 开花表型的评估:

274份世界代表性大麦样本，选自日本冈山大学生物资源研究所。在筑波种植。抽穗前，每个样本取处于开花前黄花药阶段的穗子3个，用100mg/L 2,4-D，室温处理2天。

材料和方法

之后，每个穗子取中部小穗，去除外稃，对浆片拍照，然后用Dr. H. Iwata提供的图像处理软件Maki jaku v1.1，测量浆片的宽度、长度和厚度。

材料和方法

□ 基因定位:

配制KNG x AZ 和OUH602 x KNG F2群体，在F3代统计开花习性。运用穗培法使浆片最大化。根据水稻和大麦的共线性以及大麦BAC序列，开发新的标记，用于精细定位。

材料和方法

□ BAC重叠群、测序和注释：

通过PCR进行大麦品种Morex的BAC文库筛选。采用*HindIII*指纹印迹法组装BAC重叠群。单个BAC用鸟枪法测序。根据连接载体克隆位点和亚克隆桥末端序列，对重叠群进行定向排序。

材料和方法

□ RNA原位杂交

用引物BF623536U514U794 and BF623536U514M060-23L1053, 从Cly1的3' UTR端, 扩增出一条280 bp的片断。然后, 进行原位转录和RNA原位杂交。

材料和方法

□ 定量PCR

根据基于TagMan分析的计时PCR，评估Cly1基因的表达水平。

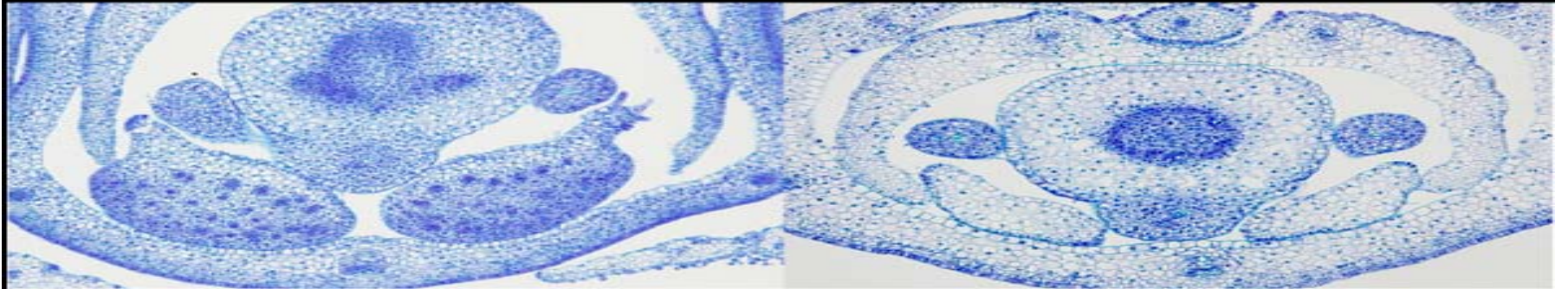
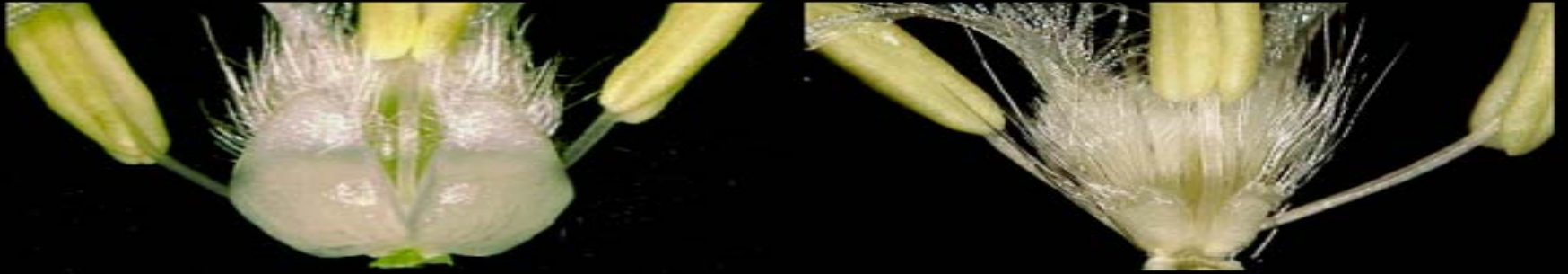
□ MiRNA介导的剪切位点作图

□ 系统发育分析

结果

■ 浆片大小与闭颖授粉

闭颖和开颖品种的浆片大小明显不同。在白花药期，浆片大小差别最为明显。此时，开颖基因型的细胞分裂比较旺盛(Fig. 1)。



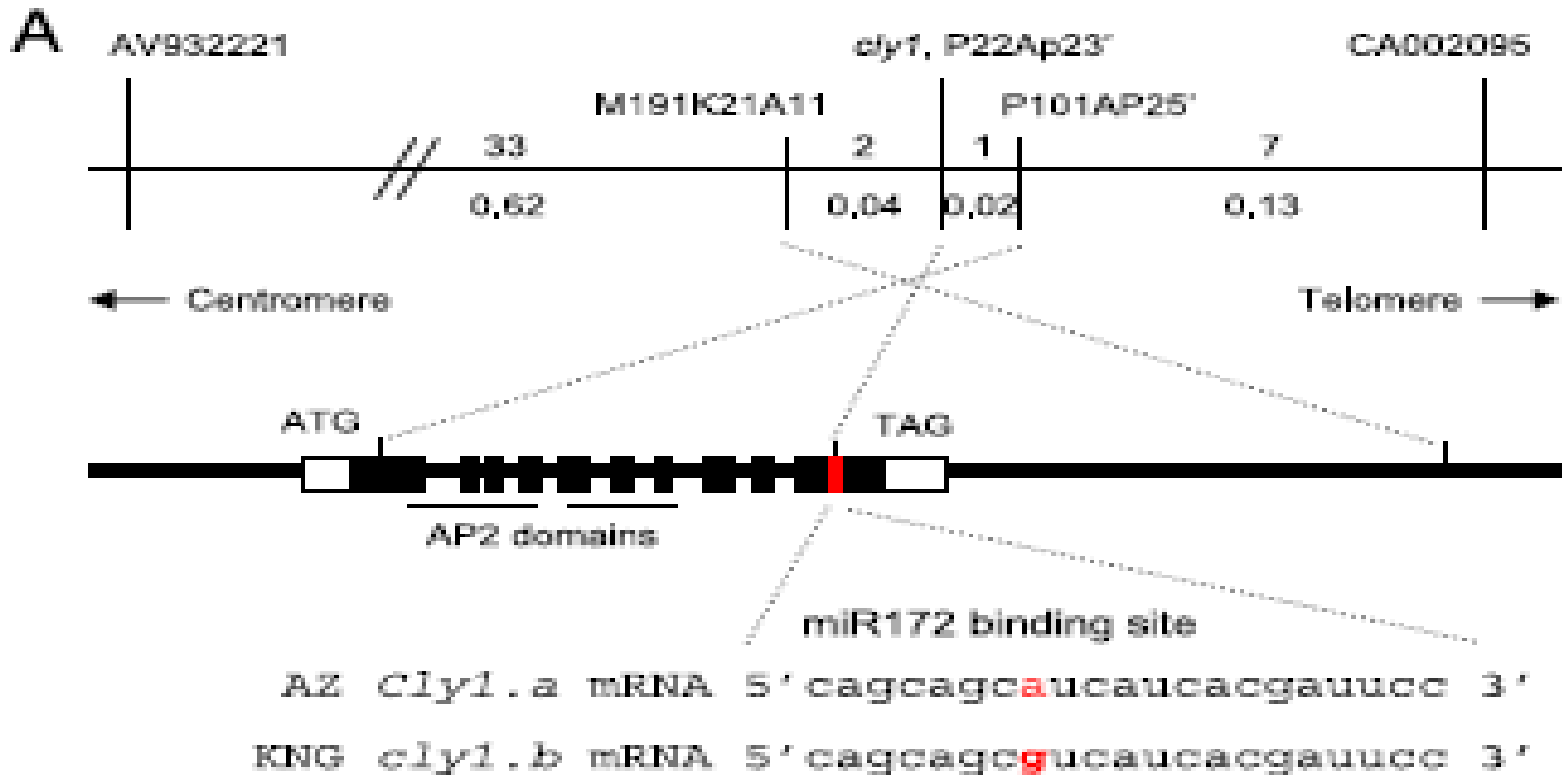
浆片大小与闭颖授粉

到绿花药期，开颖类型的浆片至少比闭颖类型的大两倍。最明显的差别表现在厚度上。开颖亲本及其与闭颖类型的杂种F1的浆片大小（长、宽、厚）没有显著差异，证实了开颖属于完全显性。

结果

- ***Cly1*** 基因编码一个属于**euAP2**家族的转录因子

通过定位克隆分离出***Cly1***，该基因定位于M191K21A11 和P101AP25'之间的一个 7 kb区间内。该区段包括***Cly1***基因的大部分编码区，并且不存在其他基因。



大麦EST(BF62356) 与水稻AP2同源，BAC标记M191k21和M60E22覆盖Cly1，编码具有2个AP2区段和1个推定的miR172靶位点。AZ和KNG仅在Cly1该靶位点存在1个碱基的不同（*cly.a*和*cly.b*）

结果

品种AZ (开颖, *Cly1.a*)的拷贝序列与KNG(闭颖, *cly1.b*)的序列相比, 存在2处碱基的不同。其中之一位于P101A P25'序列内, 并与*cly1*发生重组, 而另一个 (P22A P23') 则与*cly1*基因共分离, 对应于*Cly1*的功能位点。

结果

*Cly1*全基因从起始到终止密码子共有2691 bp，GC含量为60.8%，10个外显子由9个内含子分隔开，其编码区长度为1464bp，且为5' UTR(480bp)和3' UTR (346–368 bp)侧包围。

结果

Cly1 编码**487**个氨基酸的多肽链，具有**2**个**AP2** 结构域，一个位于**112-178**氨基酸处，一个位于**203-270**氨基酸处。第**10**个外显子中包含一个推定的 **miR 172** 靶位点序列，这也出现在一些**AP2** 基因中。

结果

在起始密码子上游**3 kb** 和**2 kb** 处，分别出现两个生长素响应元件。其序列与拟南芥**AP2**（**AT4G36920.1**）和**TOE 3**（**AT5G67180.1**）相似，同属于**eu AP2** 分支。

结果

其转录与水稻类AP2基因 Os04g 0649
100高度同源。且P22AP23'的单核苷酸
多态性也位于第10外显子上推定的miR
172 靶序列处，是一个同义突变。

结果

■ miR172靶序列多态性与浆片大小及闭颖授粉存在相关

分析了274份大麦种质资源的miR172靶序列，发现3个碱基变异。而其氨基酸序列都没有改变，因为这些碱基变异都发生在三联体密码子的最后一位。

结果

第一个变异(...**C(A/C)G**...)与闭颖授粉无关，但第二和第三个(...**(A/G) TCAT C(A/C)**...)却与闭颖授粉变异有关。实验中观察到，所有开颖品种都是 **ATCA TCA** 单倍型，表明这一单倍型可用于鉴定开颖授粉类型。并且该单倍型同样出现在野生大麦中。

结果

而闭颖授粉类型的单倍型要么为GTCA
TCA，要么为ATCATCC (Fig. 2B)。
G起始的单倍型出现包括**KNG**在内的8
个闭颖授粉的品系中。表明这一单碱
基改变，足以使大麦从开颖授粉变为
闭颖授粉。

miR172 targeting site

+	Cleistogamous	AZ	GCAGCAG CAGCAGCATCATCACGATTCCC ACCCT	
		SN	GCAGCAGCAGCAGCATCATCACGATTCCCACCCT	
		MOREX	GCAGCAGC C GCAGCATCATCACGATTCCCACCCT	
		OUH602	GCAGCAGCAGCAGCATCATCACGATTCCCACCCT	
		KNG	GCAGCAGCAGCAGC G TCATCACGATTCCCACCCT	
		MG	GCAGCAGCAGCAGC G TCATCACGATTCCCACCCT	
		GP	GCAGCAGCAGCAGC G TCATCACGATTCCCACCCT	
		SV002	GCAGCAGCAGCAGC G TCATCACGATTCCCACCCT	
		SV241	GCAGCAGCAGCAGC G TCATCACGATTCCCACCCT	
		SV242	GCAGCAGCAGCAGC G TCATCACGATTCCCACCCT	
		SV237	GCAGCAGCAGCAGC G TCATCACGATTCCCACCCT	
		SV235*	GCAGCAGCAGCAGC G TCATCACGATTCCCACCCT	
		SV223	GCAGCAGC C GCAGCATCAT C CGATTCCCACCCT	
		SV230	GCAGCAGC C GCAGCATCAT C CGATTCCCACCCT	
		SV253	GCAGCAGC C GCAGCATCAT C CGATTCCCACCCT	
SV255	GCAGCAGC C GCAGCATCAT C CGATTCCCACCCT			
		*	*	*

miR172靶位点的序列比较

结果

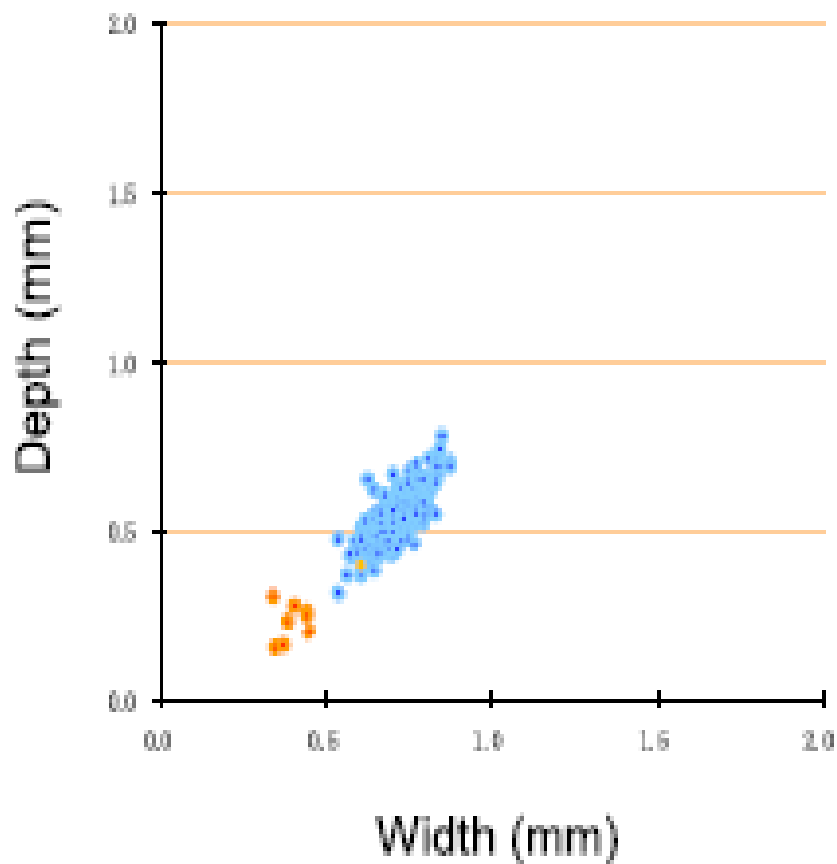
这一观点得到了 *cly1* 位点的界定和 miR 172 介导的 mRNA 剪切分析结果的支持。第二个 *cly1* 等位基因携带单倍型 **ATCATCC** (碱基 C 代替了开颖授粉类型的碱基 A)，这一单倍型出现在 4 个闭颖授粉的材料中。

结果

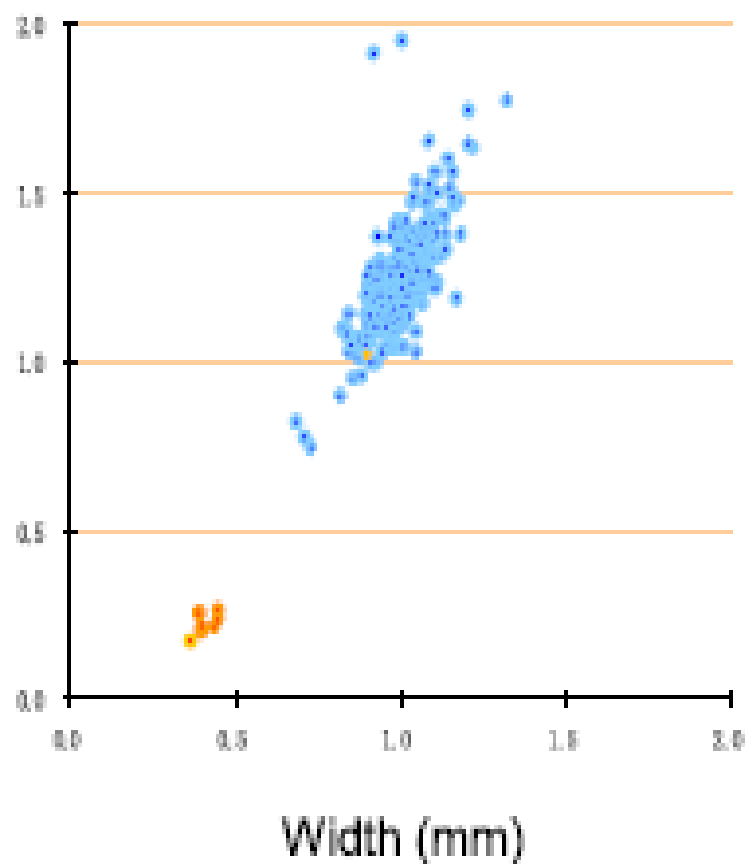
- 根据浆片大小，**274**份材料明显划分为两类。

开颖授粉类型在开花期浆片膨胀到最大，厚度和宽度分别是黄花药期的**2.3**倍和**1.4**倍，而此期闭颖材料的浆片仍然很小。浆片膨胀的主要作用是推开外稃，释放出小花。

Yellow anther stage



Anthesis stage



274分材料花药浆片大小比较：蓝颜色为开颖材料

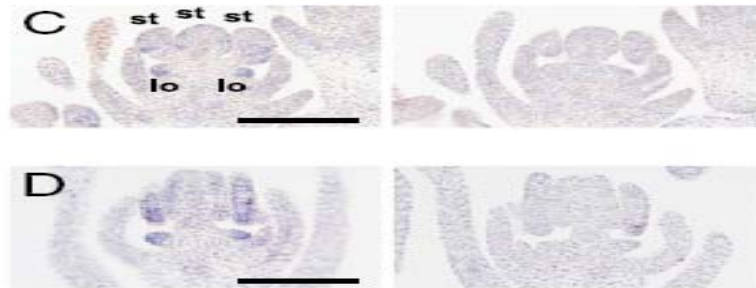
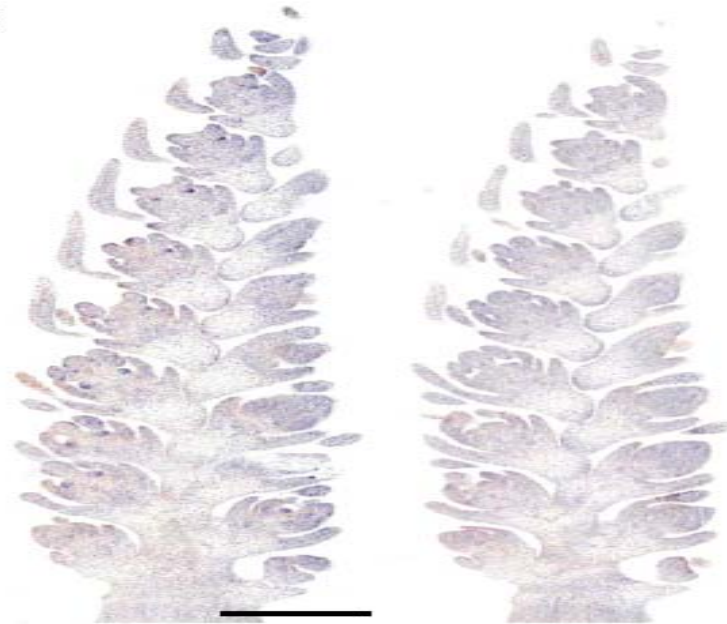
结果

然而，品系**SV235**在浆片大小与闭颖授粉性状的关系方面却是唯一的例外。该系田间表现为闭颖授粉，其浆片大小中等，经**2,4-D**处理后可以开颖授粉。**SV 235**的编码序列与闭颖品种**KNG**一致，表明要么其**Cly1**表达降低，要么存在着控制浆片发育的其他不同途径。

结果

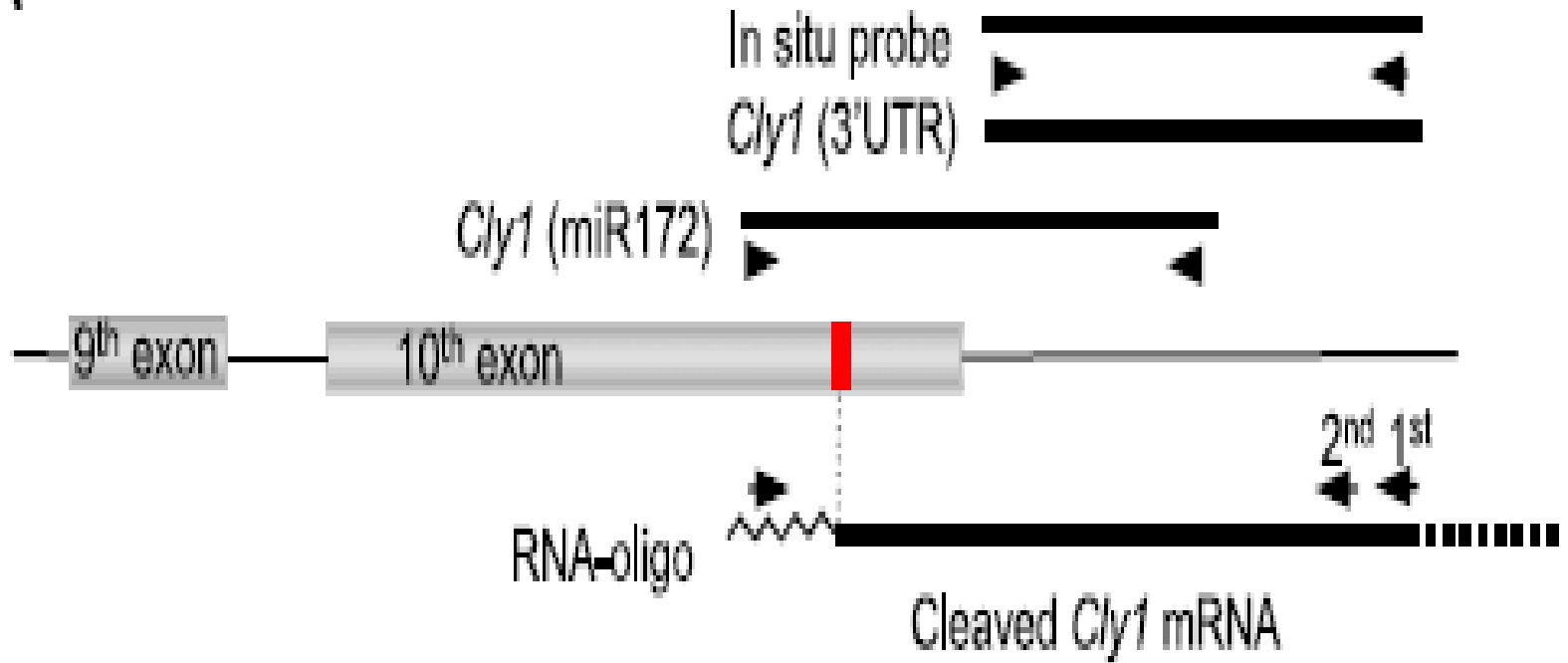
- ***Cly1***转录的**miR172**介导剪切分析
RNA原位杂交显示，*Cly1*在雄蕊原基阶段就在浆片中很好表达，杂交信号在开颖和闭颖类型的材料中都能够检测到。

3



Cly1的3'UTR转录子为探针进行原位杂交，
探测Cly1在幼穗中的表达

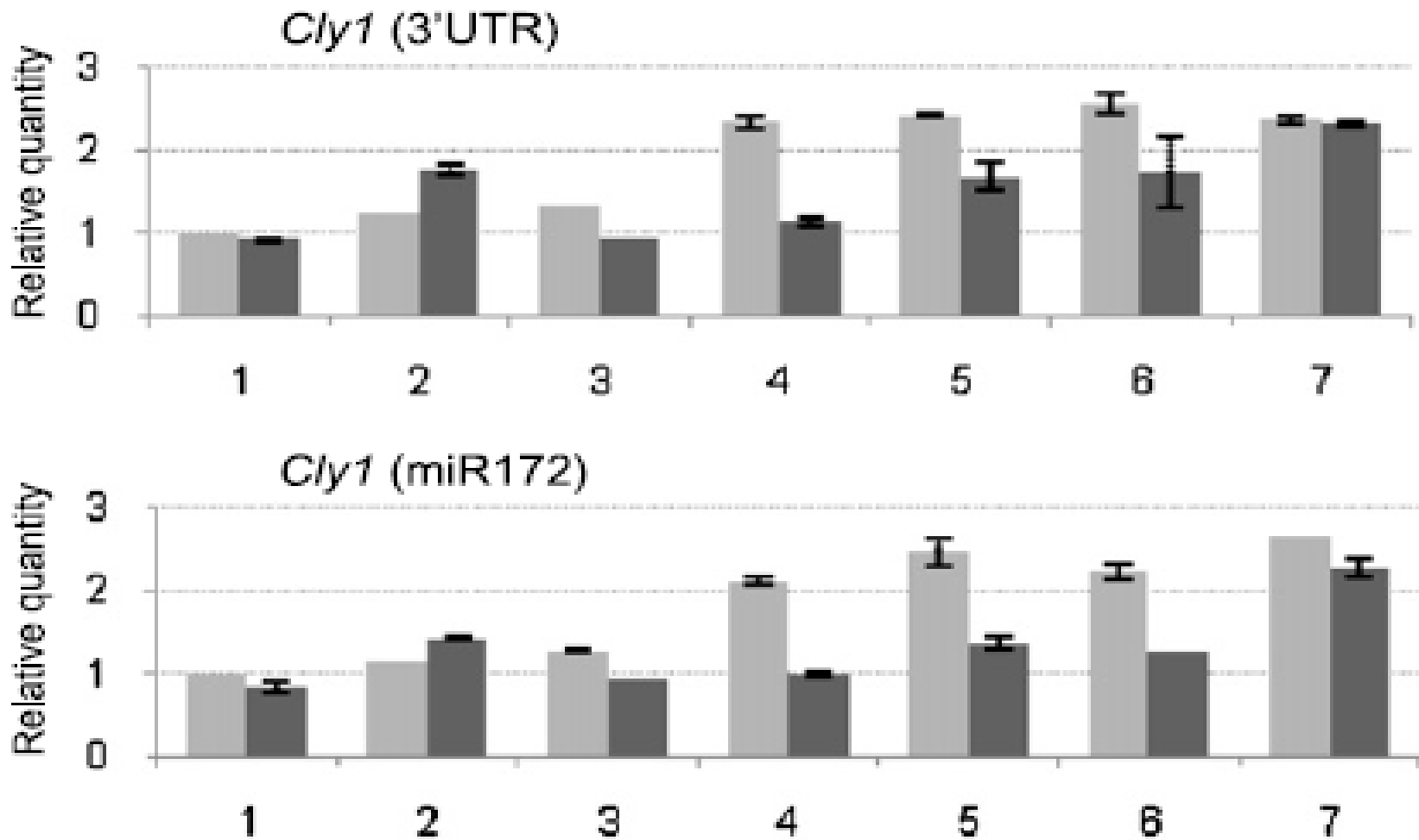
A



Cly1的3'末端含有miR172靶位点的外显子10。箭头表示反向PCR验证的2个区域；曲箭头指5'Race RNA接头与剪切mRNA连接。

结果

尽管定量PCR分析显示，携带等位基因 *Cly1.a* (AZ, 开颖) 和 *cly1.b* (KNG, 闭颖) 的材料，从芒原基阶段到黄花药时期，具有基本相同的基因表达模式，但转录强度却是KNG高于AZ。



Cly1在幼穗发育不同阶段的表达。深色为AZ（开颖），浅色为KNG(闭颖)

结果

为了解miR172介导的*Cly1*基因的mRNA剪切情况，进行了一种改进的5'RACE实验。剪切转录本的5'末端可以和GeneRacer RNA 寡聚物相连接。以miR172位点为靶进行巢式PCR，从携带*Cly1.a*材料中扩增出一条约400 bp的带，而*cly1.b*的材料却未产生该产物。

结果

表明miR172介导剪切仅发生在*Cly 1.a*材料而非*Cly1.b*。从*Cly1.a*扩增产物克隆的大多数序列均证实，在miR172靶位点内部存在一个剪切位点，大部分剪切发生在碱基A和U之间。

结果

然而，来自*cly1.b*的多数克隆均为rRNA或与*Cly1*不相关的基因，48个克隆中仅有2个包含*Cly1*部分序列(Fig. 3G)。并且多数*cly1.b*的RACE产物为呈现随机断裂的mRNA。总体而言，在mRNA水平，浆片发育和闭颖授粉取决于*Cly1*转录本的miR172介导剪切。

结果

■ 闭颖大麦的起源

系统发育分析表明，闭颖授粉有两种不同的谱系。**KNG**单倍型(*cly1.b*)与野生型**AZ**相比，仅有**2**处碱基代换，一个位于**miR172**靶序列内的**3084bp**处，另一个位于第一个外显子的**626bp**处。

结果

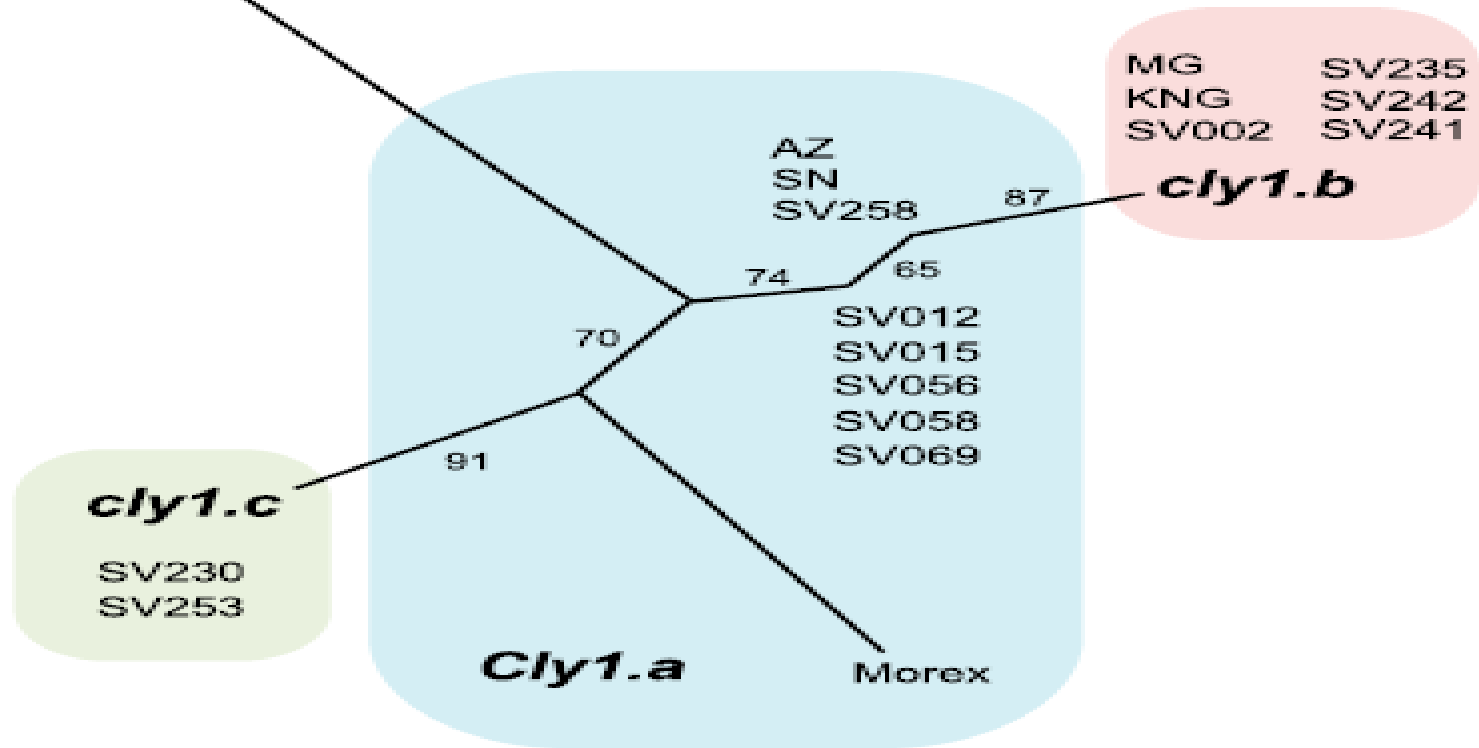
KNG单倍型有可能是**AZ**单倍型的直系后裔。而**AZ**单倍型可能是**SV012**单倍型的后裔，因为**2522bp**处的**G**是开颖品种和野生大麦所共有。第二种闭颖单倍型(*cly 1.c*)的来源不确定。

结果

但是很显然，这两种闭颖单倍型表现为独立的突变事件。***Cly1***的**3kb**编码序列没有变异，表明这两种闭颖单倍型可能是近期发生的事件。

OUH602

0.05 substitutions/site



Cly1的3个等位基因的系统发育分析

讨论

- *Cly1* 是拟南芥 *AP2* 的直系同源基因

研究表明，单子叶植物的浆片与双子叶植物花瓣结构同源。浆片比其它花器官小，而闭颖大麦的浆片更小。开颖类型浆片的内部组织结构比闭颖类型的好。前者包含维管组织使浆片在开花期能够快速吸水膨胀。

讨论

- 两种开花类型浆片的形态差异反映了器官发育变化。**ABCE**模型认为，基因网络在确立花器官的身份中发挥重要作用。具体地说，**A**类基因***AP1***和***AP2***在与**B**类基因***AP3***和***PISTILLATA (PI)***确立花瓣和雄蕊的身份中的功能重叠，尽管**A**类和**C**类基因***AGAMOUS (AG)***之间发生拮抗作用。

讨论

据认为，*AP2*的功能仅限于双子叶植物，理由是单子叶植物的花缺乏萼片和花瓣。然而，*Cly1*具有euA P2的特征：具有两个AP2结构域和位于编码区下游的一个miR172靶位点。

讨论

水稻和玉米中许多AP2类似基因已被鉴定，包括*supernumerary bract (SNB)*，*indeterminate spikelet1 (IDS1)*和*sister of indeterminate spikelet1 (sid1)*。大麦 *HvAP2L1* 也是该家族的一个成员。

讨论

这些**AP2**类似基因彼此是系统发育相关的，但与拟南芥的 *AP2* 和大麦的 *Cly1* 还是有所不同。它们可能是复制的旁系同源基因，其功能不同于 *AP2* 直系同源基因。

讨论

在系统发育上，*Cly1*与水稻Os04g0649100关系最近，并且是水稻中唯一与*AP2*关系最近的*AP2*类似基因。遗传、系统发育和基因表达的研究结果，对大麦*Cly1 (HvAP2)* 基因是拟南芥*AP2*基因直系同源基因的观点，提供了有力支持。

讨论

- 闭花授粉受microRNA的作用
已经证明大麦的闭颖由 *Cly1* 的 miR172 靶位点序列的单碱基代换决定，因为该碱基代换抑制了 miRNA 介导的 *cly1.b* 的 mRNA 剪切。有人认为是 miR172 靶序列的 *AP2* 基因翻译抑制调控或 miR172 介导的 mRNA 剪切和翻译抑制共同作用。

讨论

- 这种古老的调控系统在单双子叶植物分化以前就已经产生。**miR172**介导的**mRNA**剪切系统显然不只是在大麦中保留下来，很可能在禾本科植物中更普遍，因为所预测的**miR172**靶位点，出现在许多禾本科植物的**EST**中，并与**Cly1**转录本序列同源。

讨论

Cly1.a 转录本在该位点的剪切类似于拟南芥 *AP2* 和玉米 *gl15*。剪切位点在变异碱基下游3bp处，且 **AZ** 和 **KNG** 的序列存在差别。碱基错配是靶序列识别错误的主要原因。

讨论

例如玉米*ids1*的 *Ts6* 等位基因，miR172 3' 末端的一个单碱基错配导致小穗分生组织的不确定性。miR172靶位点的第2-12个碱基对于碱基错配特别敏感，因为该区域负责与miRNA的5' 端配对。*cly1.c*等位基因反映了miRNA172靶位点第8个核苷酸的点突变，可以同样的方式影响剪切位点的识别。

讨论

miR172介导的mRNA剪切仅发生在开颖类型中，并且转录强度显著降低。检测表明，开颖类型中的转录本被剪切掉了。问题是为什么 *Cly1.a* (开颖) 对 *cly1.b* (闭颖) 是显性？因为根据预期，*Cly1.a/cly1.b* 杂合子中未剪切的 *HvAP2* mRNA 水平较高，可以产生足够量的 *HvAP2* 蛋白来抑制浆片的发育。

讨论

- 然而，实际情况是杂种表现开颖。在拟南芥中，解释这一意外显性关系的模式，源自单个转录本的ta-siRNAs的产生。随着 miR172引导切割 *HvAP2* mRNA，产生的mRNA片断可以作为形成ds-siRNA的前体，从而引发*HvA P2* mRNA分子的完全降解，进而形成对*Cly1.a*的负调控。

讨论

在某种意义上，这可能源自***AP2***转录获得的**siRNA**，在拟南芥、水稻和大麦中共享某些重复元件。如果等位基因***Cly 1.a***产生的**siRNA**，能够与***Cly 1.a***和***cly 1.b***转录本发生作用，那么***Cly 1.a/cly 1.b***杂合子将实现开颖。

讨论

另一个模式是，如果 *cly1.b* 翻译产物的量或比例高于某个临界值，将抑制浆片的发育。如果一部分转录本被剪切，*HvAP2* mRNA 的量或比例以及 *HvAP2* 产物，降至 *Cly1.a/cly1.b* 杂合子阈值以下，导致表现开颖。

讨论

请注意，浆片的大小是一个数量性状，目前还不清楚该数量性状如何与这一阈值兼容。这些模式的检验需要对浆片中 *HvAP2* 的转录产物，进行定量分析。

讨论

拟南芥中，miR172介导的*AP2* 抑制是通过一种*Agamous(AG)*依赖途径，来促进花器官的决定及定义*B* 基因表达区域的内在边界。如果大麦中存在同样的过程，预计miR172介导的*HvAP2* 下调，将减少开颖大麦中*B* 类基因的表达，从而导致浆片的正常发育。

讨论

闭颖大麦中，由于miR172靶位点的突变，导致*HvAP2* 功能的去抑制，因而允许*B*类基因表达的恢复和浆片的形成。在水稻中，*B*类基因功能缺失的突变体(例如*PI*的同源基因*OsMADS2*和*OsMADS4*，以及*AP3*的同源基因*Superwoman1*)，发生由浆片变成苞叶状器官的同源异型转化。

讨论

玉米中，*Zmm16 (PI)* 和 *Silky1 (AP3)* 活性消失具有类似的表型效果。关于A类基因，一个玉米 *snb* 突变体（水稻 *AP2* 类似基因）允许浆片的形成和边界的确定。水稻C类基因(*OsMADS3* 和 *OsMADS58*) 的功能与 *AtAG* 相似。

讨论

因此，禾本科植物浆片的形成可能与拟南芥花瓣的形成同源。假设闭颖品种中通过对 *HvAG* 的抑制，使 *HvAP2* 的抑制解除，上调了 *B* 类基因，导致细胞分裂受抑制和传导组织的缺失，引起同源异型的不完整转化，阻止了浆片的膨大，从而形成闭颖性状。

讨论

■ 闭颖的演化

开颖是大麦的一个祖先特征，野生大麦都具有该表型。闭颖特性源于单一的位点突变。由于存在**2**种突变类型，说明至少经历了两次突变。这与大麦六棱穗型的进化相似，经过了**3**次独立的突变。

讨论

2个大麦闭颖突变中，1个可能源自北欧，因为它在英国品种中普遍出现；另1个源自南欧或西地中海地区。因为没有序列多态性或闭颖等位基因的重组，并且闭颖大麦的地理分布并不在作物的驯化地点，因此，这2个突变的发生可能是较近期的事件。

讨论

相比之下，在六棱基因(*vrs1.a*)的非编码区观察到序列变异，作为二棱野生大麦的首次突变，发生在距今8000年前的新月沃地。闭花受精在禾本科中较为普遍，但在小麦属中相当罕见。

讨论

多倍体物种中，尤其是面包小麦或硬粒小麦，*Cly1*同源基因发生单隐性突变，由于会被其他显性等位同源基因所掩盖，因此不大可能产生闭颖授粉的表型。大麦是二倍体，可以允许隐性突变基因表现出来。

讨论

对于闭颖大麦的选择可能与穗密度有关，因为带有 *cly1* 基因的品种穗型均呈直立型。 *cly1* 对穗轴节间长度的控制可能是由于与穗轴节间长度 **QTL** 之间的连锁，或者是源于 **AP2** 转录因子对穗轴节间长度的多效性。

讨论

- 第一个直穗型大麦品种**Golden Melon**是在1800年从英格兰弯穗型品种**Chevallier**选出；第二个直穗型品种**Goldthorpe**是在1889年从**Chevallier**选出。

讨论

目前还不清楚这些直穗类型是在Chevallier中发现的新突变，还是它们本已存在混合的种子之中。但无论是何种情况，在弯穗型大麦中存在直穗类型，这在当时都已足够新颖。



谢谢大家
