

拟南芥脂肪酸外运蛋白FAX1影响雄性生殖发育的机制

刘艳艳, 陈雨沁, 石垒, 石建新*

代谢与发育科学国际合作联合实验室, 上海交通大学生命科学技术学院, 上海200240

摘要: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) FAX1 (fatty acid export 1)定位于质体内膜, 向质体外运输从头合成的脂肪酸, FAX1突变显著降低了生物量和雄性育性, 但FAX1影响植物雄性生殖的机制尚不清楚。我们通过花粉粒染色、正反交和花药半薄切片观察, 发现FAX1突变延缓了绒毡层的降解, 不但影响花粉壁发育和花粉育性, 也影响授粉受精; 通过GUS染色和qRT-PCR检测揭示了FAX1在花早期发育过程的表达上升模式; 通过化学测定和扫描电镜观察发现FAX1突变还影响花器官表面结构的形成。综上所述, FAX1突变从多个方面影响植物雄性生殖发育。

关键词: 拟南芥; 脂肪酸外输; 花粉发育; 角质; 蜡质

脂肪酸是生物体的基本组成单位之一, 具有重要的生物学功能: 它们既是细胞膜脂的主要成分, 又是重要的能源物质, 还是一些信号分子的前体。脂肪酸不仅参与和影响植物的生长发育, 而且参与和影响植物对生长环境生物和非生物逆境胁迫反应(Li-Beisson等2013)。例如, 三酰基甘油(triacylglycerol, TAG), 一种植物主要的能量储存形式, 其组成与不同植物的低温抗性密切相关(Durrett等2008); 覆盖植物表面的角质和蜡质, 一类特殊的中长链脂肪酸及其衍生物, 能有效防止植物非气孔性失水, 抵御病虫害和非生物逆境胁迫, 保障植物器官正常生长发育(Pollard等2008; Shi等2011); 绒毡层细胞脂质代谢前体形成的孢粉素, 作为植物花粉外壁的主要成分, 对植物的正常发育和生殖过程有着重要的作用(Ariizumi和Toriyama 2011; Shi等2015)。

高等植物脂肪酸的从头合成途径主要发生在质体中(Li-Beisson等2013)。首先, 乙酰CoA在脂肪酸合酶体系下经过缩合-还原-脱水-还原的循环反应不断增长碳链, 然后碳链增长后的脂肪酸与酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)结合, 部分被整合到质体内膜上(原核途径), 大部分则会被运输到内质网(endoplasmic reticulum, ER)上进行进一步的加工和修饰(真核途径)(Brown等2006; Li-Beisson等2013)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)从头合成产生的脂肪酸大约有38%和62%分别进入到原核和真核合成途径, 约一半的真核途径合成的脂肪酸会重新返回到质体参与质体膜的形成(Warwick等1986)。经过内质网修饰加工后的脂肪

酸前体会被运输到细胞外, 参与不同细胞的脂类平衡和细胞的生长发育, 部分被用于蜡质和角质等保护性组织成分的形成(Li-Beisson等2013)。尽管早就观察到脂类可以跨质体膜运输, 人们对其中运输机制了解甚少, 主要是缺乏直接的证据证明有定位于质膜的脂类运输蛋白的存在(Li等2015)。

在过去的20多年里, 随着与脂肪酸运输有关的膜转运蛋白和其他调控蛋白的陆续发现, 人们对植物体内脂肪酸主动运输的本质及其整个基因网络有了更进一步的了解(Li等2016)。LTP (lipid transport protein)和ABCG (ATP-binding cassette transporter G)转运蛋白是两类研究得比较多的脂类运输蛋白, 它们主要参与植物地上器官表面角质、蜡质、地下部器官(根和块茎)软木脂、花药表面角质层及花粉孢粉素中脂肪酸前体等物质的运输(Carvalho和Gomes 2007; Zhang和Li 2014; Quilichini等2010; He等2016; Lu等2016; Zhao等2016; Wang等2017), 同时也参与TAG的运输(Kim等2013)。因为质体包膜有内和外之分, 因此, 运输脂肪进出质体的运输蛋白也可能有定位于质体内包膜和质体外包膜的区别。对这些不同质体包膜定位的行使脂类运输蛋白的功能研究, 是了解植物脂类物质进出质体机制和全面认识脂肪代谢的关键。Schnurr等(2002)的研究发现, 一个定位于质体外包膜的长链脂酰辅酶A合成酶9 (long-chain

收稿 2017-09-04 修定 2017-12-25

资助 国家自然科学基金(31671511和31461143001)。

* 通讯作者(jianxin.shi@sytu.edu.cn)。

acyl-CoA synthetase 9, LACS9)具有活化游离脂肪酸成脂肪酰辅酶A的功能,方便脂肪酸的进一步被分配。由于缺少合适的突变体,对定位于质体内包膜的脂类运输蛋白的功能研究一直没有取得进展。

2015年, Li等(2015)报道了拟南芥FAX1 (fatty acid export 1)介导质体脂肪外运的功能。FAX1定位于质体内包膜,能够调控质体内脂肪酸往质体外的运输。FAX1基因的突变会导致内质网合成的脂类物质(包括TAG)含量的显著降低和质体内合成脂类物质的显著积累,从而导致植物体内脂肪酸代谢紊乱,最终影响植物生物量、育性及不同脂类物质的合成(Li等2015)。FAX1参与花粉壁的形成,其突变体由于缺少来自于绒毡层的用于合成花粉外壁和花粉外被的脂类前体物质,花粉壁发育异常(Li等2015)。但FAX1影响花药和花粉发育的具体过程及机制并没有得到清楚的阐述。本文系统研究了突变体花药和花粉不同阶段发育的形态变化,结合基因的表达模式分析和突变体花朵角质及蜡质含量的测定以及电镜观察,进一步明确了FAX1基因在拟南芥雄性生殖发育过程中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 植物材料

拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]野生型(wild-type, WT) Col (Columbia)、突变体*fax1-1* (SAIL_66_B09)和*fax1-2* (GABI_599E01) (Li等2015)均由德国路德维希马克西米利安慕尼黑大学(Ludwig Maximilians University) Katrin Philipp教授馈赠。所有拟南芥植物都在人工培育室内进行培养。培养条件: 温度22°C, 湿度50%~70%, 光暗周期16 h/8 h。

1.2 GUS质粒构建、农杆菌侵染和转基因植株的筛选

根据NCBI (national center of biotechnology information)网站公布的FAX1所在的基因组信息 (GenBank登录号: AT3g57280), 我们设计了以下引物: FAX1pro-F (5'-CGGTACCCGGGGATCC-TTTCTGCTGGTGAAGGGAGGTT-3')和FAX1pro-R (5'-ATTTACCCTCAGATCTCGTCCAGATCTGATACCGAAAATT-3'), 并在上游和下游

引物的5'端分别添加了*Bam*HI和*Bgl*III (下划线所示)限制性内切酶位点,在拟南芥基因组中扩增位于FAX1基因上游的大小约为1 500 bp的启动子序列,然后通过重组酶将其连接到含有GUS标签的pCAMBIA1301载体上,得到含有FAX1启动子元件的表达载体p1301proFAX1并转化到GV3101农杆菌。液体培养PCR验证的阳性菌株并离心沉淀。用转化缓冲液重悬沉淀的农杆菌并浸泡萌发后生长1个月左右的拟南芥植株的花蕾15 s。此后,将植株平放于盘中过夜。第二天将转化的植株转移到正常的条件下生长。待植株生长发育成熟后,收取T₀代种子。将T₀代种子铺于含潮霉素(Hyg 50 μg·mL⁻¹)的1/2筛选培养基上,于4°C黑暗条件下春化3 d后见光培育,7 d后将抗性苗移到土中继续生长,直至收取T₁代种子。种植T₁代植株,继续收取T₂代种子。在T₂代植物中挑选抗性比为3:1的单基因独立株系。继续筛选,获得纯和突变体植株。

1.3 半薄切片

采集不同发育阶段的拟南芥花序,迅速置于含FAA固定液的玻璃小瓶中,用真空泵进行抽气,直到花序材料全部沉至瓶底为止。依次用不同浓度乙醇对固定后的样品进行梯度脱水(70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇各处理30 min; 100%无水乙醇处理2 h; 含饱和番红染液的100%无水乙醇处理2 h),再将脱水后的材料放置于无水乙醇与Basic liquid Technovit 7100等体积混合液中预渗透处理1~2 h。然后,将预渗透处理的材料放于一定比例配制的渗透液(1 g硬化剂I溶解于100 mL Basic liquid Technovit 7100)中过夜。将渗透液处理后的样品用包埋液(1 mL硬化剂II溶于15 mL渗透液)包埋在包埋板中,放于60°C烘箱烘干48 h以上。最后使用电动转轮切片机(RM2265)进行切片,切片厚度保持在2.0 μm。切好的材料使用0.1%甲苯胺蓝染液进行染色,漂洗烘干后,使用中性的树脂封片。

1.4 扫描电子显微镜(scanning electronic microscopy, SEM)观察

1.4.1 花粉的SEM观察

取拟南芥成熟花药,置于25°C的烘箱中烘干过夜2~3 d,然后在体视镜下用镊子将花药剥开,使花粉散落。将剥离的花粉粘附在铜台导电胶上,喷金处理后进行观察。

1.4.2 新鲜材料的冷冻扫描电子显微镜(Cryo-SEM)观察

取新鲜拟南芥材料,在体视镜下用镊子把需要观察的组织快速分解开,并用少量胶水粘附于铜台上,液氮快速冷冻后进行喷金处理,再进行扫描观察。

1.5 亚历山大染色和碘液染色及观察

亚历山大染色及观察:取正在开放的拟南芥小花,并将其放置于盛有亚历山大染液(亚历山大母液:水=3:47, V/V)的EP管中过夜,然后制作成玻片样品,置于光学显微镜下观察。

碘液(I₂-KI)染色及观察:取拟南芥成熟花药,并将其置于载破片上,用镊子小心挤出花药中的花粉,再用10 μL 1%的碘液染色2 min,随后制作成玻片样品,置于光学显微镜下观察。

1.6 蜡质和角质的测定

收集拟南芥野生型和突变体小花(12期之前),迅速投入放置有液氮的EP管内,随后进行冷冻真空干燥备用。每组样品设置4个生物学重复,每份样品干重约为10 mg。蜡质、角质的提取和测定方法参考我们实验室之前发表的文章(Chen等2011)。

1.6.1 蜡质测定

将样品置于氯仿清洗的玻璃小瓶中,加入1 mL氯仿,混合均匀,抽提30 s,吸取氯仿抽提液到另外一个干净的玻璃瓶。重复此抽提步骤一次,将2次抽提氯仿混合。在氯仿抽提液中加入10 μg内标后,用氮吹仪浓缩溶剂至100 μL,再转移至反应小瓶中。在干燥室内,向反应瓶中加入20 μL BSTFA [bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; Machery-Nagel, Düren, Germany]和20 μL吡啶(pyridine),混合均匀后,在70°C烘箱内温育40 min。随后将反应产物转移至GC小瓶分析。所有样品都要经气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)和气相色谱-火焰离子检测器(GC-flame ionization detector, GC-FID)分析。

1.6.2 角质测定

蜡质抽提剩下的植物材料样品,可直接用于角质的测定。具体步骤如下:向样品中加入2 mL氯仿/甲醇(按体积比1:1混匀)进行洗涤,每隔1 d换液1次,连续处理2周。处理完后的样品置于通风橱吹干后,称重并记录,然后将干燥的样品置于新玻璃瓶中,加入1 mL的1 mol·L⁻¹的甲醇盐酸,置于

80°C烘箱处理2 h。之后加入2 mL饱和的NaCl水溶液和20 μg的内标物,混匀后用2 mL正己烷抽提3次。将3次所得的抽提液混合,氮吹仪浓缩至100 μL后再衍生,衍生条件与蜡质分析一样。衍生后的样品直接用于GC-FID和GC-MS分析。

2 实验结果

2.1 拟南芥*fax1*突变体的鉴定

为了进一步了解FAX1突变对拟南芥雄性不育的影响,我们对两个FAX1基因的T-DNA突变体SAIL_66_B09 (*fax1-1*)和GABI_599E01 (*fax1-2*)进行了PCR鉴定。经典的三引物(正向引物LP、反向引物RP、T-DNA插入片段上特异引物LB1-SAIL或LB2-GABI) PCR扩增和随后的Sanger测序结果表明*fax1-1*和*fax1-2*都是纯合突变体(图1-A)。*fax1-1*突变体的T-DNA插入位点在FAX1基因的第一个内含子上(ATG后第234~235 bp);*fax1-2*突变体的插入位点在FAX1基因的第二个外显子上(ATG后第85~86 bp)(图1-B)。以上的突变体鉴定结果与Li等(2015)之前的鉴定结果一致,说明我们获得的*fax1-1*和*fax1-2*突变体就是Li等报道的*fax1-1*和*fax1-2*突变体。因为Li等(2015)通过反转录PCR证明了*fax1-1*和*fax1-2*都是FAX1的功能缺失突变体,所以,我们获得的*fax1-1*和*fax1-2*的突变体为纯合的FAX1功能缺失突变体。

2.2 FAX1突变导致雄性不育

之前的研究表明,FAX1基因的突变不仅会影响植物的营养生长,也会影响植物的生殖发育(Li等2015)。为了深入研究FAX1基因在拟南芥生殖发育过程中的特殊作用,我们观察了*fax1*突变体的表型性状。与野生型植株相比,进入生殖生长阶段的*fax1-1*和*fax1-2*突变体植株非常矮小、瘦弱,茎秆纤细且分枝较少(图2-A)。利用体式镜近距离观察授粉后的花,我们发现突变体花的柱头正常,但雄蕊短小,且柱头上鲜有附着的花粉,表明*fax1*突变体不能像野生型一样完成正常的授粉过程(图2-B)。对成熟角果的观察发现,突变体角果短小,长度约为野生型角果的1/4,且角果内几乎没有种子(图2-C)。这个实验进一步证实,FAX1功能缺失不仅抑制了植物的营养生长,而且影响了授粉过程,导致植物育性降低。

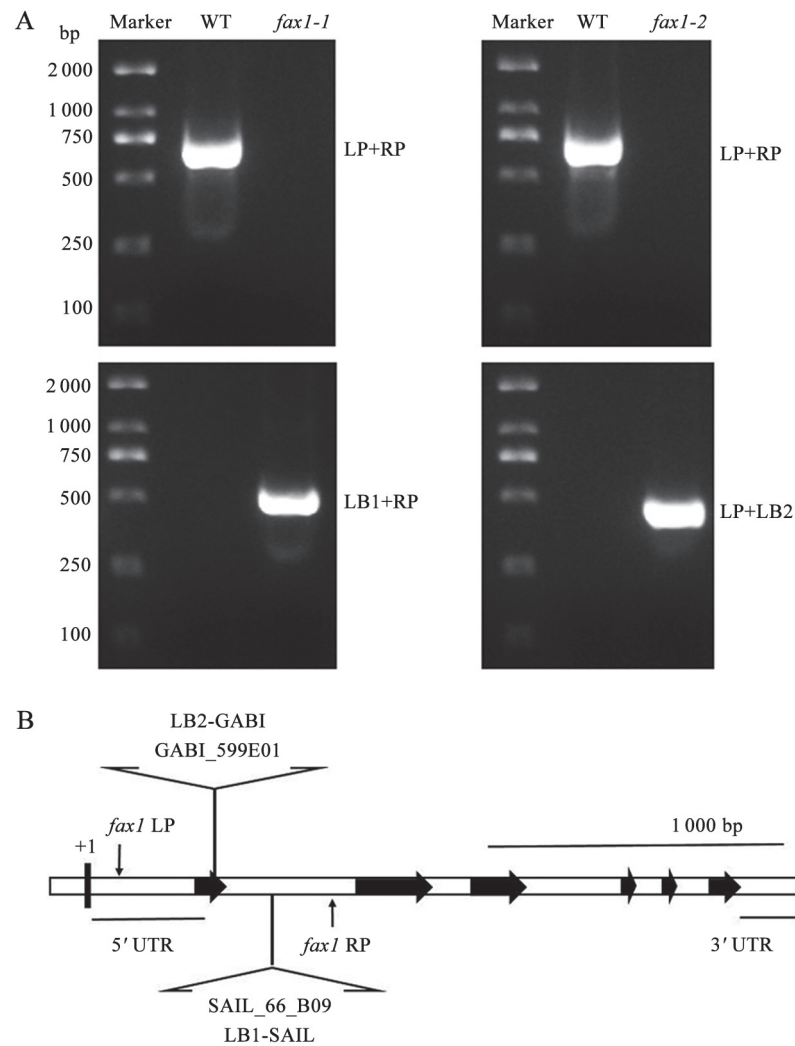


图1 拟南芥*FAX1* T-DNA突变体的鉴定

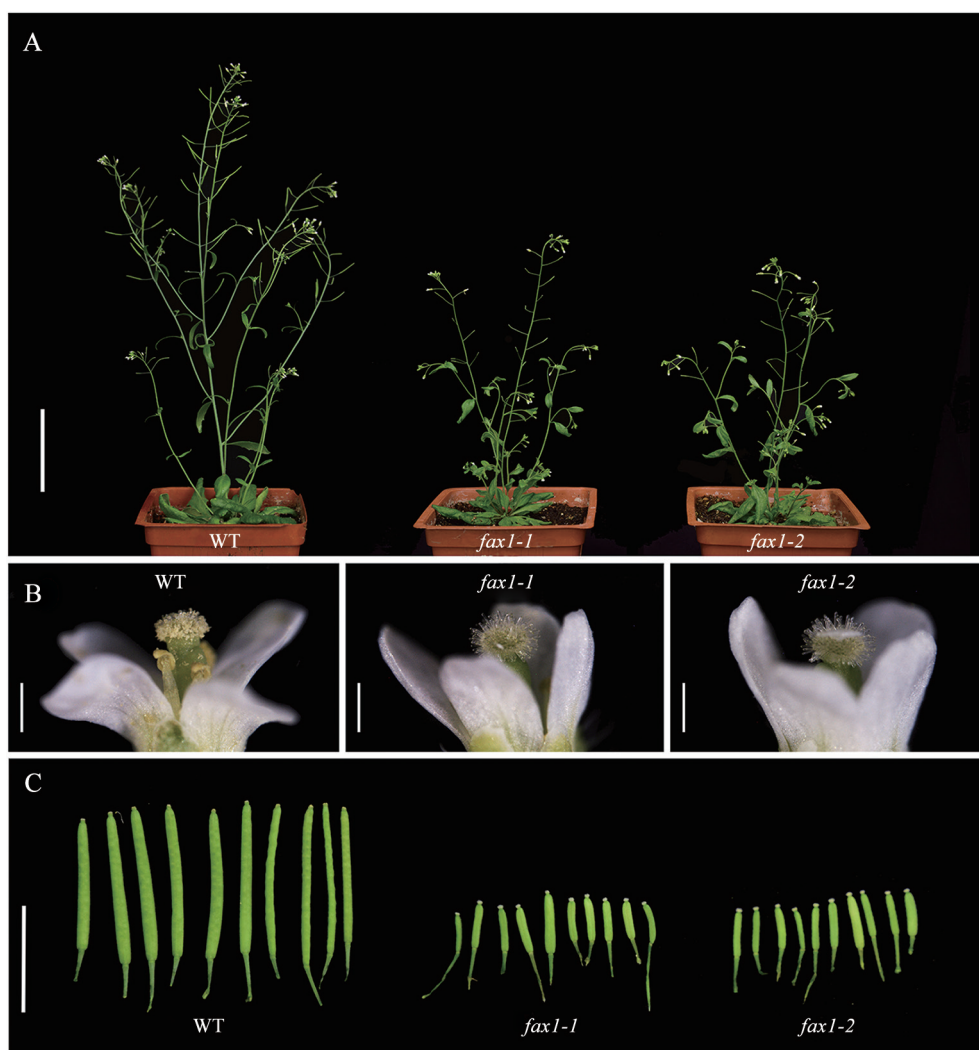
Fig.1 Characterization of *FAX1* T-DNA mutants of *Arabidopsis*

A: *fax1-1*和*fax1-2*突变体鉴定的PCR电泳图; B: *fax1-1*和*fax1-2*突变体T-DNA插入位点示意图。

2.3 *fax1*突变体花药发育异常

为了进一步研究*fax1*不育的原因,我们将野生型和*fax1-2*纯合子植株进行了正反交实验。将野生型花粉授到*fax1-2*柱头上后,植株的育性和角果发育正常。但将*fax1-2*花粉授到野生型柱头上,植株的育性显著下降,产生几乎无种子的短角果。结果表明,除了授粉受精过程异常外,*fax1*突变体花粉的发育也异常。为此,我们分别对野生型和突变体的成熟花药进行了亚历山大染色。野生型花药腔内的花粉呈饱满的圆球形,花药染色较深,花粉染色轮廓清晰;而突变体花药腔内的花粉形状不规则、形态不完整、边界不清晰,花药染色较浅,花粉染色极浅且不均匀(图3-A)。同时,我们

对成熟花粉粒进行了碘液染色处理,结果显示,视野内野生型成熟花粉粒多且染色正常,而同一视野内突变体成熟花粉不但数量少,且染色浅(图3-B)。进一步放大观察发现,野生型花粉粒呈饱满的椭球形,外围没有明显染色边缘;突变体花粉则呈圆形,外围有明显的蓝色圈(图3-C)。我们还对成熟花粉表面进行了SEM观察,结果显示,野生型花粉呈规则的椭圆形,外表覆盖有典型的网格花粉外壁结构,而*fax1-1*和*fax1-2*的花粉塌陷或皱缩,外表面比较光滑,缺失野生型那样完整的网纹外壁结构(图3-D)。以上结果表明,*FAX1*突变不但影响了授粉受精,也影响了花粉外壁发育,导致花粉败育,从而影响花粉育性。

图2 拟南芥野生型和*fax1*突变体的表型分析Fig.2 The phenotypic analysis of wild-type *Arabidopsis* and *fax1* mutantsA: 生长6周的植株(标尺=10 cm); B: 成熟花(标尺=500 μ m); C: 成熟角果(标尺=1 cm)。

2.4 FAX1突变延缓了绒毡层的降解

为了进一步探索FAX1基因对雄性生殖过程的影响,我们系统比较了野生型和*fax1-2*花药不同发育阶段的细胞学特征(Sanders等1999)。8期之前,*fax1-2*突变体和野生型不同发育阶段花药的细胞学特性间不存在明显差别(图4)。9期开始直至11期,野生型绒毡层开始并完成降解,而*fax1-2*突变体绒毡层细胞的降解则明显迟缓于野生型,可见FAX1突变影响到绒毡层的降解。*fax1-2*中绒毡层的延迟降解,导致花粉外壁不能正常形成,致使12期花药腔内粘附着大量碎片状物质,妨碍了花粉的释放(图4)。这些结果表明,FAX1突变可能延

迟了绒毡层细胞的降解,进而影响了花粉外壁的形成。

2.5 FAX1基因在花发育早期大量表达

之前的数据表明,FAX1具有广谱表达特性(Schmid等2005),在植株的各个部位,如根、茎、叶和花中,均能检测到它的表达。为了进一步明确FAX1与植物雄性育性的关系,我们着重分析了FAX1在整个花发育过程中的表达情况。首先,我们构建了p1301proFAX1GUS质粒,通过农杆菌转化获得稳定遗传的GUS植株并对生长5周左右的阳性转基因植株花序进行了GUS染色,结果表明,FAX1基因主要在早期未开放花朵的花药中表达,

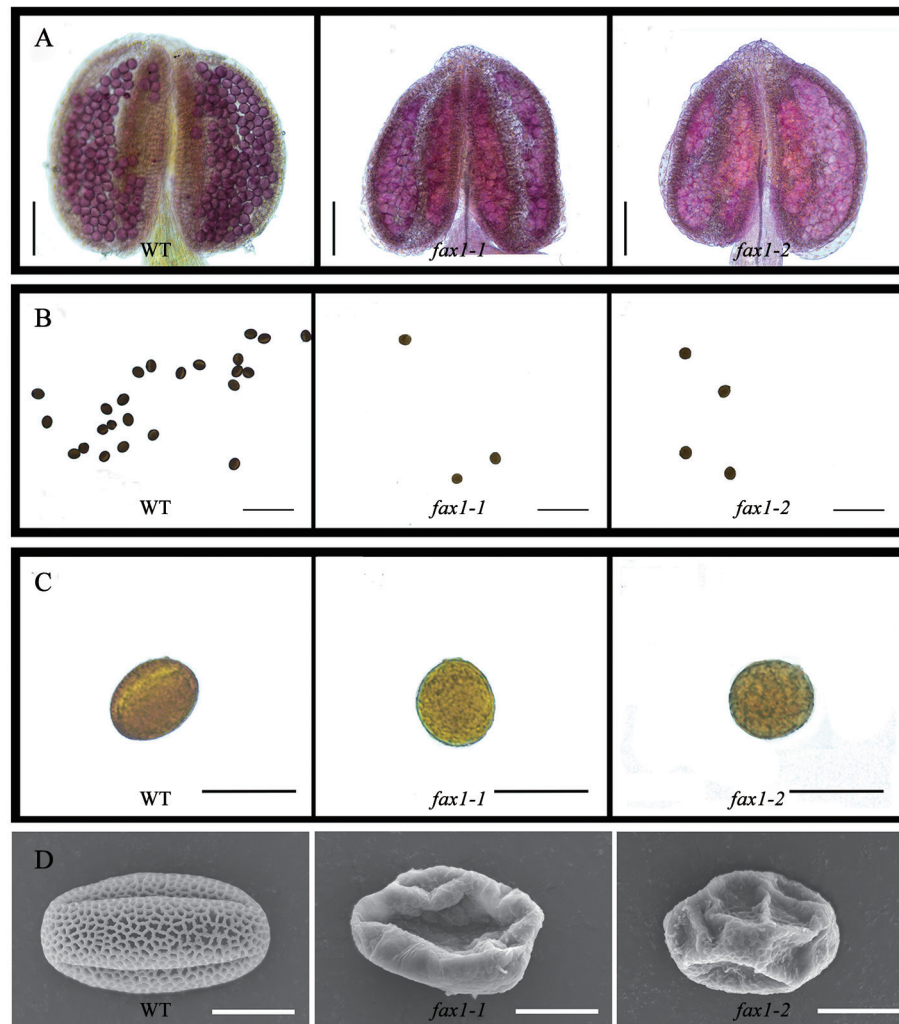


图3 拟南芥野生型和*fax1*突变体的育性分析

Fig.3 Fertility analysis of wild-type *Arabidopsis* and *fax1* mutants

A: 亚历山大染色(标尺=500 μm); B: 花粉碘液染色(标尺=500 μm); C: 花粉碘液染色(标尺=250 μm); D: 花粉的扫描电镜观察(标尺=10 μm)。

开放花朵中(13期)几乎检测不到GUS信号(图5-A)。其次,我们采用qRT-PCR对不同发育时期花中*FAX1*的表达进行了检测,结果表明*FAX1*在花发育早期大量表达,表达高峰出现在12期(图5-B)。这种表达模式与*FAX1*基因在雄性生殖发育过程中的功能相吻合。

2.6 *FAX1*突变影响了花器官表面结构的形成

因为脂肪酸运输突变体通常会影响到花器官表面结构的形成(Panikashvili等2011),我们对野生型和*fax1*突变体的花器官(花瓣和花萼等组织)进行了Cryo-SEM观察。结果显示,*FAX1*突变影响了花瓣表皮细胞形状及表面结构的形成。首先,野生型花瓣表面细胞呈现标准的圆锥形,突变体表皮细

胞形态异常,有明显的尖状凸起。其次,野生型表皮细胞表面呈现典型的网纹状角质结构,而突变体远轴端和近轴端的表皮细胞表面都是光滑的(图6-A~D)。*FAX1*突变对其他花器官的表面结构并没有显著的影响(图6-E~J)。

花瓣表面角质结构的变化表明*FAX1*突变影响到花器官表面角质层的形成。为了证明这一点,我们对拟南芥野生型和*fax1-2*突变体花蕾(12期及之前的花蕾)进行了蜡质和角质的代谢测定分析。蜡质测定结果表明,*fax1-2*突变体花药的蜡质总含量[5.759 μg·mg⁻¹ (DW)]略高于野生型[4.398 μg·mg⁻¹ (DW)],可能源于突变体中主要的烷烃(C29:0 ALK)和固醇物质(stigmasterol)成分的明显增加(图7-A)。

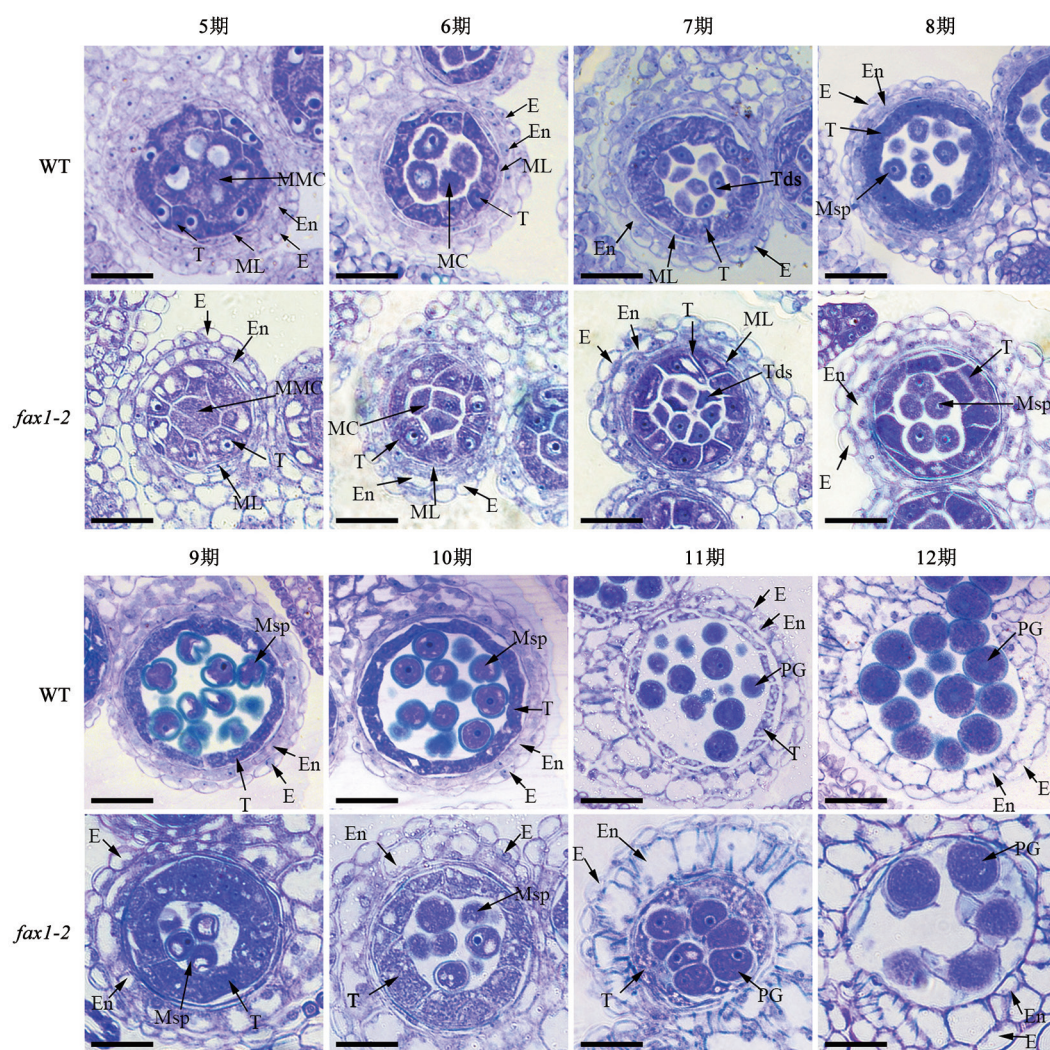


图4 拟南芥野生型和*fax1-2*突变体花药发育不同阶段的细胞学比较分析
Fig.4 Comparative cytological analysis of anthers at different developmental stages between wild-type *Arabidopsis* and *fax1-2* mutant

E: 表皮层; En: 内层; ML: 中层; T: 绒毡层; MMC: 小孢子母细胞; MC: 减数分裂细胞; Tds: 四分体; Msp: 小孢子; PG: 花粉粒。标尺=500 μm 。

角质测定结果表明, 突变体花蕾总角质含量[1.110 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (DW)]显著小于野生型[3.266 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (DW)], 几乎所有测到的角质成分均有明显的减少(图7-B); 这与冷冻电镜观察到的突变体花瓣表面角质的明显减少相一致。蜡质和角质的测定结果表明, *FAX1*突变影响了花蕾组织角质层脂类代谢的平衡。

3 讨论

脂肪酸的代谢对植物的正常生长发育至关重要。脂肪酸的代谢涉及到脂肪酸在质体的从头合

成、在内质网的修饰加工和组装等, 因为所处的细胞器不同, 脂肪酸运输对于脂肪酸的代谢是必不可少的。之前的研究多集中于植物表面脂类物质如蜡质、角质和软木脂等的运输(Shi等2015; Zhao等2016; Wang等2017), 很少涉及到质体内从头合成的脂肪酸运输(Schnurr 2002; Li等2015)。FAX1是一个定位于质体内包膜的脂类运输蛋白, 负责质体从头合成脂肪酸的往外跨膜运输。*FAX1*的突变不但影响拟南芥的营养生长, 也影响其生殖生长, 主要是影响了花粉壁外壁和花粉被前体的合成(Li等2015)。因为这两类物质的前体都与

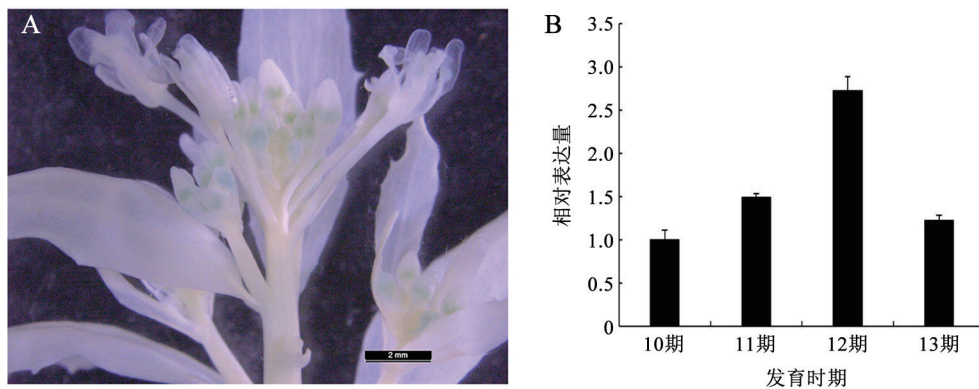


图5 拟南芥FAX1的表达模式分析

Fig.5 Expression analysis of FAX1 in *Arabidopsis*

A: 花序的GUS染色(标尺=2 mm); B: 不同发育时期花中FAX1的qRT-PCR。

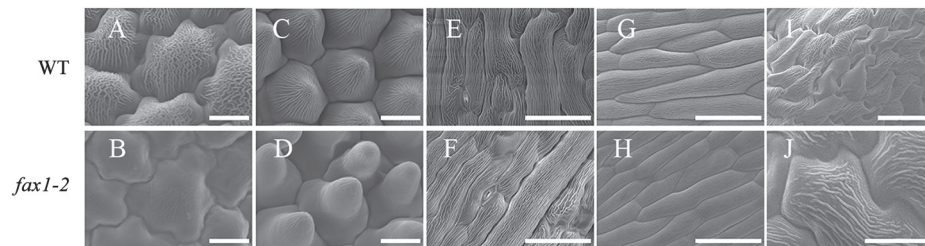


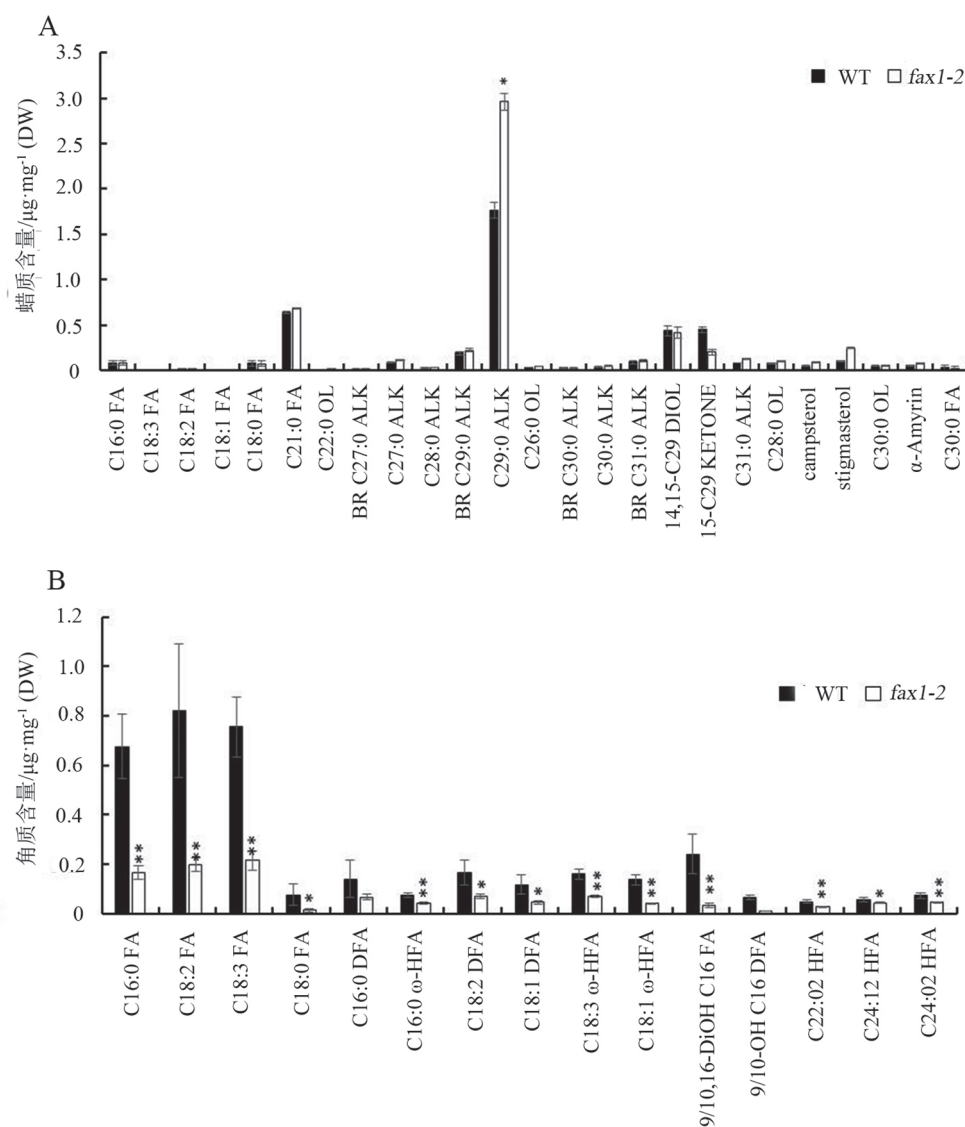
图6 拟南芥野生型和fax1-2突变体花器官表面的Cryo-SEM图

Fig.6 Cryo-SEM images of floral organ surfaces in wild-type *Arabidopsis* and *fax1-2* mutantA和B: 花瓣远轴端表面(标尺=10 μm); C和D: 花瓣近轴端表面(标尺=10 μm); E和F: 花萼远轴端表面(标尺=50 μm); G和H: 花丝(标尺=50 μm); I: 花药(标尺=20 μm); J: 花药(标尺=10 μm)。

脂肪酸代谢密切相关(Blackmore等2007; Pollard等2008), 因此, 有必要从花粉发育的不同阶段入手系统研究FAX1对植物雄性生殖发育过程的影响。本实验以拟南芥*fax1*突变体为研究对象, 通过对花粉育性的染色和扫描电镜观察以及正反交实验, 证明了FAX1基因的突变不但影响授粉受精过程, 还影响了花粉外壁的发育, 导致雄性不育。

植物花粉外壁是一层多种化学物质组成的特殊保护结构, 保护发育中的雄性生殖孢子免受可能遇到的各种生物和非生物胁迫的伤害。尽管花粉外壁真实的化学组成还没有完全得到阐述, 越来越多的实验证实绒毡层细胞可以分泌孢粉素和花粉外被的前体, 用于花粉外壁的形成(Bedinger 1992; Kim和Douglas 2013; Scott等2004; Piffanelli等1998)。因此, 绒毡层降解或孢粉素(或花被)前体合成突变体通常都会影响花粉外壁的形成(Ariizumi和Toriyama 2011; Shi等2015)。之前对花药和

花粉的结构分析表明, FAX1突变影响花粉壁的形成, 特别是花粉外壁和花粉外被的形成(Li等2015)。因为这两种脂类物质都来源于绒毡层, 作者猜测FAX1可能通过调节绒毡层质体合成脂肪酸的外运来影响花粉外壁和花粉外被的形成(Li等2015)。我们的半薄切片观察发现, FAX1突变延缓了绒毡层降解(图4), 影响了花粉外壁孢粉素和花粉外被前体物质的释放, 从而严重影响了花粉壁的正常形成。这可能是FAX1突变导致雄性不育的主要原因。但我们目前还不清楚*fax1*突变体中绒毡层质体脂类物质外运受阻是如何影响绒毡层降解的。类似的绒毡层降解延缓表型在水稻*osabcg26*突变体中也存在, OsABCG26是一个定位于水稻花药壁质膜上的脂类运输蛋白(Zhao等2015)。有意思的是, *osabcg26*突变体的花药中层降解也受到抑制(Zhao等2015), 而这个现象在*fax1*突变体中似乎也同样存在(图4)。因此, 至少在水稻和拟南芥中, 花

图7 拟南芥野生型和*fax1-2*突变体花芽中蜡质(A)和角质(B)成分分析Fig.7 Wax (A) and cutin (B) profiles in flower buds of wild-type *Arabidopsis* and *fax1-2* mutant

FA: 脂肪酸类; DFA: 二羧酸; OL: 烷醇类; HFA: 羟基脂肪酸类; ALK: 烷烃酸类; BR: 支链。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

粉外壁合成前体脂类物质运输基因的突变, 都会影响到花药壁特别是绒毡层和中层的降解, 进而影响到花粉壁的形成。*fax1*突变体柱头上鲜有花粉粒这个表型(图2-B)说明突变体不能像野生型那样顺利完成授粉受精过程。之前的研究发现突变体花药开裂有问题, 因此, 突变体释放很少的花粉(Li等2015)。而我们的观察却发现突变体花药粗短不能接触到雌蕊柱头以完成授粉(图2-B), 这才可能是这个表型的真正原因。出现这种不一致的表型可能与不同的实验条件相关, 也可能与关注

的重点不同有关。我们还观察到, 后期突变体花药腔内有大量的绒毡层降解残片(图4), 覆盖或粘附在表面没有完整网纹外壁结构的花粉粒上(图3-D), 形成粘连(图3-A)。这可能导致了花粉释放量的减少, 但花药开裂并没有受到影响。

尽管*FAX1*基因广谱表达(Schmid等2005), 我们的qRT-PCR结果发现*FAX1*在花早期发育过程中呈明显上调趋势, 并在12期达到高峰。12期是拟南芥花蕾开始开放的关键时期, 此时花器官特别是花瓣的发育正处于旺盛期(Smyth等1990)。

*FAX1*的这种表达方式可能与花器官(如花瓣)的发育和随后的花朵开放有关,因此,*fax1*突变体花瓣表面特征出现异常(图6-A~D)。由于*FAX1*在花粉早期发育的表达模式(单双核期最高,三核期及之后明显下降)(Li等2015)和其在花早期发育不尽相同,因此,*FAX1*的不同表达模式可能是*FAX1*同时影响多种花器官发育的原因。另一方面,我们的GUS染色结果也证明了*FAX1*在早期花药中的高表达,再次验证了*FAX1*对雄性生殖的重要性。因为拟南芥中*FAX1*的同源基因还有3个(*FAX2~4*),我们也测定了其他3个*FAX*基因在花发育过程中的表达量变化,它们在花发育过程的表达量都明显小于*FAX1*。即便如此,我们也不能排除*FAX2~4*与*FAX1*之间存在功能冗余的可能性,因为*fax1*突变体没有完全雄性不育。这一点将会是我们进一步深入研究的重点。

Li等(2015)的研究表明,*FAX1*突变并不影响茎(营养器官)表面的蜡质和角质的积累,但*FAX1*突变显著影响了叶和花组织中游离脂肪酸和膜脂成分的平衡,说明*FAX1*单突变不能影响所有植物脂类的代谢,这与其他3个*FAX*基因(*FAX2~4*)的功能冗余有关。我们的Cryo-SEM发现*fax1*突变体花瓣表面角质成分明显减少。同时,基于GC-MS和MS-FID的代谢分析结果也证实,*FAX1*基因突变改变了花药表面角质层的代谢,导致蜡质合成上升而角质合成下降。该结果表明,*FAX1*介导的质体脂类外运过程同样影响花器官表面角质层脂类的代谢。已有的研究结果表明多数花器官表面角质层合成突变体的育性也受到影响(Shi等2011),结合本研究的结果,花器官表面角质层脂类合成的前体和花粉壁脂类物质合成前体均与质体外运的脂类物质相关。在突变体花的早期发育过程中,*FAX1*的突变影响了蜡质和角质前体物质的运输,造成角质和蜡质物质合成的紊乱,也影响了花粉外壁孢粉素合成前体和花粉外被合成前体的运输,导致花粉壁发育缺陷和育性下降。

综上所述,本研究以质体脂肪酸外运蛋白*FAX1*的突变体为材料,以雄性生殖发育为重点,从形态学、细胞学、分子生物学和分析化学等不同角度,进一步阐明了*FAX1*通过调控脂类外运影响植物雄性生殖发育的机制,为研究脂类代谢特别

是脂类运输对植物生殖发育的影响及机制提供了重要的理论依据和借鉴。

参考文献(References)

- Ariizumi T, Toriyama K (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol*, 62: 437–460
- Bedinger P (1992). The remarkable biology of pollen. *Plant Cell*, 4 (8): 879–887
- Blackmore S, Wortley AH, Skvarla JJ, et al (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol*, 174: 483–498
- Brown AP, Affleck V, Fawcett T, et al (2006). Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 57: 1563–1571
- Browse J, Warwick N, Somerville CR, et al (1986). Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, 235 (1): 25–31
- Carvalho AO, Gomes VM (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—a concise review. *Peptides*, 28: 1144–1153
- Chen WW, Yu XH, Zhang KS, et al (2011). *Male sterile2* encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 157: 842–853
- Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J*, 54: 593–607
- He ZN, Wang SS, Ma H, et al (2016). Peptide hormones *CHAL*, *CLL1*, and *CLL2* are important for stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol J*, 52 (2): 167–176 (in Chinese with English abstract) [何卓娜, 王双双, 马红等(2016). 胞外多肽激素基因*CHAL/CLL1/CLL2*在拟南芥雄蕊发育过程中发挥重要作用. *植物生理学报*, 52 (2): 167–176]
- Kim S, Douglas CJ (2013). Sporopollenin monomer biosynthesis in *Arabidopsis*. *J Plant Biol*, 56: 1–6
- Kim S, Yamaoka Y, Ono H, et al (2013). AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 773–778
- Li NN, Gugel IL, Giavalisco P, et al (2015). FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. *PLoS Biol*, 13: e1002053
- Li NN, Xu CC, Li-Beisson YH, et al (2016). Fatty acid and lipid transport in plant cells. *Trends Plant Sci*, 21: 145–158
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, et al (2013). Acyl-lipid

- metabolism. *Arabidopsis Book*, 11: e0161
- Lohmann JU (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet*, 37 (5): 501–506
- Lu JN, Ye JY, Xu JX, et al (2017). Quantitative proteomics analysis reveals the signaling networks downstream of EMS1 in the regulation of anther development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol J*, 53 (7): 1287–1296 (in Chinese with English abstract) [陆佳楠, 叶娟英, 许俊旭等(2017). 定量蛋白质组学方法揭示受体蛋白激酶EMS1调控拟南芥花药发育的下游信号网络. *植物生理学报*, 53 (7): 1287–1296]
- Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, et al (2011). The *Arabidopsis* ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytol*, 190 (1): 113–124
- Piffanelli P, Ross JH, Murphy DJ (1998). Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex Plant Reprod*, 11 (2): 65–80
- Pollard M, Beisson F, Li YH, et al (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci*, 13: 236–246
- Quilichini TD, Friedmann MC, Samuels AL, et al (2010). ATP-binding cassette transporter G26 is required for male fertility and pollen exine formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 154: 678–690
- Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, et al (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod*, 11 (6): 297–322
- Schnurr JA, Shockey JM, Boer GJ, et al (2002). Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 129: 1700–1709
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell*, 16 (Suppl): S46–S60
- Shi JX, Cui MH, Yang L, et al (2015). Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. *Trends Plant Sci*, 20: 741–753
- Shi JX, Malitsky S, Oliveira DS, et al (2011). SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of *Arabidopsis* flower organs. *PLoS Genet*, 7: e1001388
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2: 755–767
- Wang XZ, Sun WM, Ma YF, et al (2017). Research progress of ABC transporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol J*, 53 (2): 133–144 (in Chinese with English abstract) [王晓珠, 孙万梅, 马义峰等(2017). 拟南芥ABC转运蛋白研究进展. *植物生理学报*, 53 (2): 133–144]
- Zhang DB, Li H (2014). Exine export in pollen. In: Markus G (ed). *Plant ABC Transporters*. Switzerland: Springer International Publishing, 49–62
- Zhao GC, Shi JX, Liang WQ, et al (2015). Two ATP binding cassette G transporters, rice ATP binding cassette G26 and ATP binding cassette G15, collaboratively regulate rice male reproduction. *Plant Physiol*, 169: 2064–2079
- Zhao GC, Shi JX, Liang WQ, et al (2016). ATP binding cassette G transporters and plant male reproduction. *Plant Signal Behav*, 11: e1136764

Investigations into the mechanisms underlying the effects of *Arabidopsis thaliana* fatty acid export 1 (FAX1) in male reproductive development

LIU Yan-Yan, CHEN Yu-Qin, SHI Lei, SHI Jian-Xin*

Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences; School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: *Arabidopsis thaliana* fatty acid export 1 (FAX1) is a plastid protein localized in the inner envelope. It exports *de novo* synthesized fatty acids out of plastid, and its loss-of-function mutation reduces biomass and male fertility significantly. Up to date, the mechanisms underlying *FAX1* mutation on male fertility remains obscure. In this study, our cytological analysis and reciprocal cross results revealed that *FAX1* mutation not only delayed tapetum degradation that led to impaired pollen wall formation and reduced pollen fertility, but also affected pollination. In addition, GUS staining and qRT-PCR results indicated that *FAX1* expression increased significantly along the early stages of flower development. Furthermore, chemical analysis and electronic microscopy observation results showed that sepal surface patterning in *FAX1* mutant was impaired as well. Altogether, our findings suggest that *FAX1* mutation affects multiple aspects of male reproductive development.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; fatty acid export; pollen development; cutin; wax

Received 2017-09-04 Accepted 2017-12-25

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31671511 and 31461143001).

*Corresponding author (jianxin.shi@sjtu.edu.cn).