油菜每角果粒数差异的细胞学基础和分子机理

李永鹏[†], 程焱[†], 蔡光勤, 范楚川, 周永明^{*}

华中农业大学植物科学技术学院, 作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: ymzhou@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2014-05-10; 接受日期: 2014-06-15

国家自然科学基金(批准号: 31371659)和国家油菜产业技术体系(批准号: nycytx-00503)资助项目

doi: 10.1360/052014-87

摘要 每角果粒数在油菜不同品种、品系或其他种质资源之间存在着较大的变异. 该性状的研究对于利用优良变异提高油菜产量具有重要意义. 对多个 DH 系和常规栽培种进行分析, 研究了油菜每角果粒数差异形成的细胞学基础和分子机理. 结果表明, 部分胚珠原基在发育过程中败育而不能最终形成成熟的种子, 正常发育胚珠百分比是每角果粒数差异的重要决定因素. 细胞学分析确定了胚珠败育发生的时期是在大孢子退化之后, 单核期配子体形成之前. 研究结果还显示, 油菜胚珠败育率的差异可能是由 BRs-BRI1 信号途径调控水平的差异所致.

关键词

油菜
每角果粒数
DH 系
胚珠发育
油菜素内酯

油菜(*Brassica napus*)是我国最重要的油料作物, 不断增加籽粒产量潜力是油菜遗传改良的首要目标. 每角果粒数是构成油菜单株产量的三大因子之一, 在油菜种质资源之间存在着较大的变异. 由于这种变异的原因尚不清楚, 油菜每角果粒数形成的潜能还远没有被有效利用^[1-3]. 油菜种子的形成起始于胚珠原基, 而胚珠原基需要经历珠被、珠心和胚囊的形成, 以及授粉、受精、种子发育等过程才能最终形成种子. 这一系列过程受到严格复杂的遗传网络调控.

油菜每个角果中胚珠发生数决定了油菜每角果粒数的最大潜能. 许多开花植物中, 胚珠数目要远大于最终形成的种子数^[4], 这种现象在油菜也有报道^[1,3,5,6]. 因此, 胚珠发生数可能并不是限制种子数目的关键因素. 然而, 对其他物种如蚕豆(*Vicia faba*)^[7]、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)^[8]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[9]的相关研究表明, 增加胚珠

发生数确实可以提高果荚内的种子数. 有研究认为, 胚珠(胚囊)的发育是影响每角果粒数的主要原因. 在开花当天, 子房内的胚珠并不一定都具有授粉潜能, 部分胚珠是败育的. 这些败育的胚珠即使在花粉量充足时, 也不能完成受精, 从而限制了每角果粒数^[2,10]. Wang 等人^[3]认为, 可能有很大一部分雌蕊接受到的花粉数低于子房内胚珠数. 此外, 还有研究显示, 蜜蜂(*Apis mellifera*)传粉可以增加每角果粒数^[11]. 这些结果表明, 子房接受的花粉数量也是影响每角果粒数的因素. 除上述因素外, 雌雄蕊形态、花粉活力、花粉和柱头的互作、花粉管的伸长、双受精、种子的发育等过程可能也会对每角果粒数产生一定影响.

遗传学分析表明, 油菜每角果粒数可能受一系列自然位点变异产生的数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)的调控^[12], 其遗传完全受到核基因控

引用格式: 李永鹏, 程焱, 蔡光勤, 等. 油菜每角果粒数差异的细胞学基础和分子机理. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 822-831

Li Y P, Cheng Y, Cai G Q, et al. Cytological basis and molecular mechanism of variation in number of seeds per pod in *Brassica napus*. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 822-831, doi: 10.1360/052014-87

制^[13], 以加性效应为主^[14]. Zhang 等人^[15]利用联合分离分析的研究发现, 油菜每角果粒数可能受到 2 个主效基因和一系列微效基因的控制. 基因定位已鉴定出多个与每角果粒数相关的 QTL. Radoev 等人^[16]定位到了 3 个位于 A5, C1 和 C9 染色体上的 QTL, 可以分别解释 6.8%, 8.2% 和 3.6% 的表型变异. Shi 等人^[17]定位到了多个影响每角果粒数的 QTL, 其中很大一部分 QTL 存在与种植环境的互作效应. Zhang 等人^[18,19]利用加倍单倍体(double haploid, DH)系定位到了 2 个分别位于 A8 和 C9 染色体上的 QTL, 并利用近等基因系进一步把 C9 染色体上的 QTL 精细定位到一个 1.005 Mb 的区段内.

最近的研究表明, 油菜素内酯(brassinosteroids, BRs)参与了拟南芥胚珠的发生、发育和每角果粒数的调控^[9,20]. 在植物中, BRs 至少存在着 2 条信号转导路径, 一条依赖于具有蛋白激酶活性的细胞表面受体 BRI1^[21], 另一条不依赖于 BRI1^[22]. 在依赖 BRI1 的信号路径中, BRs 被 BRI1 感知后, 经信号转导激活 BZR 家族的转录因子, 调节受 BRs-BRI1 信号调控的基因的表达^[23-26].

迄今为止, 对油菜每角果粒数差异形成的机制还知之甚少. 本研究选取每角果粒数存在较大变异的油菜品种纯系和 2 个常规品种, 系统地观察了这些基因型从胚珠原基发生到种子成熟的发育过程. 分析结果证实, 油菜角果中正常发育胚珠百分比是决定每角果粒数差异的重要因素, 胚珠败育主要由胚囊的败育所致, 这种败育可能发生在孢子退化之后, 单核期配子体形成之前. 进一步分析显示, BRs-BRI1 信号水平的差异可能是导致胚珠败育率差异的原因.

1 材料与方法

1.1 植物材料

用于每角果粒数差异形成分析的材料共 11 份, 包括华双 4 号(华 4)和中双 11 号(中 11) 2 个栽培品种和 9 个 DH 系. 这些 DH 系来自每角果粒数较高的华双 5 号与每角果粒数较低的甲 7005 杂交 F₁ 代小孢子培养. 根据 2009~2010 年在武汉(2 年), 2010 年在黄冈和甘肃共 4 个种植环境的考种结果(网络版附表 1), 这些 DH 系可分为 2 类: (i) 生育期、角果长度和单

株产量相当, 每角果粒数和千粒重有较大差异, 包括 C4-146, C4-58B 和 C4-41 3 个系; (ii) 生育期、千粒重和产量相当, 每角果粒数有较大差异, 包括 C18-131, C4-247, C18-43C, C18-129 和 C4-265B 5 个系. 另外还有一个随机选择的系 C4-38A.

上述材料于 2011 年秋季种植在武汉华中农业大学实验农场的试验田. 每个系种植 1 行, 每行 12 株, 行距 30 cm, 行宽 1.4 m, 3 次重复.

1.2 观察材料的取样及统计指标

(1) 胚珠发生数. 包括早期胚珠数和后期胚珠数, 分别取主花序基部 1~3 mm 和 4 mm 以上的花蕾, 使用相差干涉(differential interference contrast, DIC)显微镜观察并统计胚珠数目.

(2) 正常发育胚珠百分比. 利用石蜡切片和 DIC 显微镜观察统计具有授粉潜能的胚珠比例. 用细线标记主花序基部花的开放时间, 标记 4 天后开始取样供石蜡切片观察胚珠或种子的发育情况.

(3) 每角果粒数. 包括基部每角果粒数和主花序每角果粒数. 前者于收获后取主花序基部发育正常、每角果粒数较多的 5 个角果统计每角果粒数; 后者在主花序上随机选取 10 个角果统计每角果粒数.

此外, 在 C4-146, C4-58B, C18-43C 和 C4-247 的侧生花序上取各个发育阶段的子房, 通过石蜡切片观察胚珠的发育过程.

1.3 细胞学观察方法

(1) DIC 显微镜观察. 将子房从花蕾或花中剥离出来, 用 50% 福尔马林-醋酸-酒精(formaldehyde-acetic acid-alcohol, FAA)固定液(50% 乙醇+5% 乙酸+3.7% 甲醛)固定并保存. 制片观察时, 先用蒸馏水浸泡洗去 FAA, 然后用 8 mol/L NaOH 处理 1~3 h; 用蒸馏水洗去 NaOH 后, 于载玻片上将子房压开并用镊子剔除子房壁, 仅保留胚座框和胚珠; 最后滴加透明剂(水合氯醛:甘油:水=8:1:2)并盖上盖玻片放置 6~12 h 后于微分干涉显微镜上观察拍照.

(2) 切片观察. 石蜡切片按照常规步骤进行, 用 Thermo HM360 切片机(美国)切片, 在 Nikon Eclipse 80i DIC 显微镜(日本)下观察拍照.

1.4 基因表达分析

(1) RNA 提取. 采用 Invitrogen(美国)的 TRIzol

试剂按照厂家的标准方法提取。

(2) 反转录。采用 TransGen(北京)的 cDNA 第一链合成试剂盒按照产品说明进行。

(3) PCR。用于表达分析的引物见网络版附表 2。PCR 程序为 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, Tm 40 s, 72℃ 90~105 s, 34~35 个循环; 72℃ 5 min; 25℃, 5 min。Tm 值见网络版附表 2。循环数依表达量而定, 一般 34~35 个循环, *BnActin* 一般 28 个循环。

(4) 电泳检测。2%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)拍照。

2 结果

2.1 不同材料胚珠发生数比较

前人研究表明, 从胚珠原基的发生到花的开放, 在拟南芥中大约需要 6 天^[27], 在油菜中需要 11 天以上^[2]。本研究比较了部分材料花蕾早期阶段(图 1A)和

图 1 胚珠发生的观察和统计分析

A: 原基阶段子房内胚珠的 DIC 图像; B: DIC 观察珠被完全形成后子房内胚珠; C: 早期胚珠数和晚期胚珠数比较; D: 不同材料胚珠发生数比较。最小差异法, $P < 0.05$

花蕾晚期阶段(图 1B)的胚珠发生数, 并进行了差异显著性分析(图 1C). 结果显示, 对于同一种材料, 在早期和晚期统计的胚珠数不存在显著差异. 因此, 在胚珠原基发生到花开放期间的任意阶段, 都可进行胚珠发生数的统计.

对 11 个材料胚珠发生数的比较(图 1D)显示, 不同材料变异为 23.1~35.7, 其中 DH 系变异为 26.5~35.7. 而中 11 和华 4 无显著性差异.

2.2 油菜胚珠败育的过程

为了在油菜中观察胚囊发育, 对 C4-146、C4-58B、华 4 和中 11 等 4 个材料中开花当天的子房和开花 4 天后的角果进行了石蜡切片观察, 以确定开花当天胚囊的发育状况以及开花后的受精情况. 结果显示, 开花当天胚囊的发育状况有 2 种类型: (i) 具有 2 个极核和中央细胞液泡的正常胚珠(图 2A 和 C); (ii) 珠心未退化的不正常胚珠(图 2B 和 D). 开花 4 天后的早期种子也有 2 种类型: (i) 具有清晰的游离胚乳核的正常发育类型(图 2E); (ii) 珠心未退化的不正常类型(图 2F).

前人研究表明, 正常胚囊发育过程中伴随着珠心细胞的程序性死亡^[28]. 本研究观察到, 发生珠心退化、含有 2 个极核的胚珠能发育成正常的种子(图 2A 和 E); 相反, 珠心完整不退化是胚囊发育异常的一种表现, 珠心未退化的胚珠不能完成双受精的过程, 不能进行正常的种子发育(图 2B 和 F). 可以在开花当天清晰地观察到胚珠中的极核(图 2C)或未退化的珠心(图 2D), 据此, 可以判断胚珠是否具有授粉的潜能.

2.3 正常发育胚珠百分比是每角果粒数差异的重要决定因素

采用上述方法和标准, 统计了 7 个材料开花当天具有授粉潜能的胚珠百分比(图 3). 结果显示, 各材料正常发育胚珠百分比存在较大差异, 变异范围为 32.6%~86.8%, 其中, 中 11 和华 4 正常发育胚珠百分比分别为 84.4%和 63.8%.

在确定了每角果粒数的差异主要发生在胚珠发生阶段和胚珠的发育阶段后, 对供试材料的胚珠发生数、正常发育胚珠百分比、正常发育胚珠数和每角果粒数进行了相关性分析. 胚珠发生数与正常发育胚珠百分比两者之间的相关系数不显著(图 4A), 胚珠发生数与每角果粒数之间的相关系数为 0.539(图

图 2 胚珠授粉潜能观察

A, B: 开花当天石蜡切片观察胚珠的发育; C, D: 开花当天 DIC 观察胚珠的发育; E, F: 开花 4 天后观察种子的发育; A, C: 具有授粉潜能的胚珠; B, D: 不具有授粉潜能的胚珠; E: 授粉的胚珠; F: 未授粉的胚珠. CV: 中央细胞液泡; EN: 胚乳核; N: 完整不退化的珠心; PN: 极核

图 3 不同材料正常发育胚珠百分比比较

最小差异法, $P < 0.05$

4B), 也未达到显著性水平. 正常发育胚珠百分比和正常发育胚珠数与每角果粒数的相关系数均达到极显著水平(图 4C 和 D). 这表明, 正常发育胚珠数直接

图4 每角果粒数调控因素的相关分析

A: 胚珠发生数与正常发育胚珠百分比; B: 胚珠发生数与每角果粒数; C: 正常发育胚珠百分比与每角果粒数; D: 正常发育胚珠数与每角果粒数. **: $P < 0.01$

决定每角果粒数($r=0.987$), 而正常发育胚珠百分比的差异是每角果粒数差异形成的主要原因($r=0.913$).

2.4 胚囊败育的细胞学基础

由上述结果可知, 限制每角果粒数的关键因素是胚囊发育异常导致的胚珠败育. 为了确定胚囊败育的细胞学基础, 对 DH 系中的 4 个材料 C4-146, C4-58B, C18-43C 和 C4-247 各发育阶段的子房进行石蜡切片, 比较正常胚珠和败育胚珠中胚囊的发育情况.

在正常发育的胚珠中, 胚珠原基发生不久, 珠心即分化出大孢子母细胞(图 5A 和 a). 减数第一次分裂形成二分体, 其中靠近合点端的功能细胞较大, 位于珠孔端的非功能细胞较小(图 5B 和 b), 显示出典型的蓼型胚囊特征^[29,30]. 减数第二次分裂形成四分体后, 非功能大孢子很快降解, 内外珠被快速生长, 外珠被和内珠被先后包裹珠心(图 5C 和 c). 内外珠被闭合一段时间之后, 功能大孢子细胞形态和大小发生明显变化, 主要表现为细胞染色加深, 细胞体积增大, 细胞沿合点-珠孔轴伸长并呈现泪滴形(图 5D 和 d), 标志着孢子体已开始向配子体转换^[31,32]. 3 次有丝分裂使配子体先后进入二核期(图 5E 和 e)、四核期和八核期, 再经核移动、细胞化以及极核融合形成七细胞八

核胚囊(图 5F 和 f). 上述正常胚囊发育过程与前人在拟南芥^[30,33]和油菜^[34]中观察到的结果一致.

在败育的胚珠中, 发育后期的子房(成熟胚囊形成之后所对应时期, 图 5F 和 f)石蜡切片结果显示, 败育的胚囊除少数可以观察到膨大、染色加深的大孢子(图 5I 和 i)或二核期配子体外, 大多数情况观察不到大孢子的增大或以后时期的特征, 表明胚囊的败育应该发生在单核期之前. 同时, 败育的胚囊中可以观察到明显的大孢子退化的痕迹, 表明胚囊的败育应该发生在大孢子退化阶段或之后. 大孢子的退化从四分体形成不久就开始, 在外珠被刚闭合时退化一般都可以完成. 取外珠被刚闭合的胚珠(图 5C 和 c)进行观察的结果显示, 在该阶段几乎所有的胚囊都可以完成非功能大孢子的正常退化. 对在此之前的二价体(5B 和 b)时期的观察则显示, 在败育胚珠中减数分裂过程是正常的.

上述分析表明, 胚囊的败育可能发生在在大孢子退化之后, 单核期配子体形成之前. 这之间最主要的发育阶段为配子体发生的起始, 即功能大孢子通过生理生化 and 细胞形态的变化形成一个染色加深、体积增大并具有特定形态单核配子体的过程. 对二核期及以后阶段败育胚珠的观察发现, 在大孢子退化痕迹的位置, 能观察到未膨大的功能大孢子(图 5G, g, H 和 h). 综合上述结果, 推测配子体发生起始的障

图 5 正常和败育胚珠/胚囊的发育对比(A~I)及局部放大图(a~i)

A~F(a~f): 正常发育的胚珠, A(a): 大孢子母细胞阶段胚珠; B(b): 二分体阶段胚珠; C(c): 外珠被刚包裹珠心, 功能大孢子尚未膨大; D(d): 功能大孢子刚膨大阶段胚珠; E(e): 二核期胚珠; F(f): 胚囊完全发育阶段胚珠; G~I(g~i): 异常发育的胚珠, G(g): 发育阶段与 E(e)相对; H, I(h, i): 发育阶段与 F(f)相当. MMC: 大孢子母细胞; DYAD: 二分体; FM: 功能大孢子; DM: 降解的非功能大孢子; EFM: 增大的功能大孢子; FG: (二核期)雌配子体; PN: 极核; EC: 卵细胞

碍可能是胚囊败育的主要原因。

2.5 高胚珠败育率材料中 BRs 合成关键基因 *BnCYP85A1* 的表达量上调

配子体发育起始相关基因表达的下调和 BRs 信号途径的下调都可能导致正常发育胚珠百分比的降低^[9,20,35]。为了确定每角果粒数差异显著的 C4-146 ($19.0 \pm 1.8 (\bar{x} \pm SE)$) 和 C4-58B ($11.1 \pm 2.5 (\bar{x} \pm SE)$) 中正常发育胚珠百分率差异的原因, 分析了 2 个材料中配子体发育起始相关基因 *AGP18* 和 BRs-BRI1 信号途径相关基因 *BnBZR1* 和 *BnCYP85A1* 的表达。

AGP18 是通过增强子捕获得到的一个与配子发育相关的基因, RNAi 下调表达该基因后, 部分胚珠由于配子体发生起始受到影响而导致胚囊败育。而且, 这种影响具有雌配子特异性^[35]。然而, *BnAGP18* 基因在每角果粒数较低的 C4-58B 中具有相对较高的表达量(图 6A), 因此, C4-58B 相对于 C4-146 较高的胚珠败育率不是由此基因的表达差异而导致。

BnCYP85A1 是 BRs 合成的关键基因^[36], 也是 BRs-BRI1 信号途径的下游基因^[37,38]。该基因在

图 6 配子体发生起始及 BRs 途径相关基因在 C4-146 和 C4-58B 中的表达分析

A: 配子体起始相关基因的表达分析; B: BRs-BRI1 信号途径基因的表达分析

C4-58B 中的表达量相对 C4-146 明显提高(图 6B), 提示在这 2 个胚珠败育率有着显著差异的系中, BRs-BRI1 信号途径的调控水平可能存在差异。BRs-BRI1 信号途径的关键转录因子 *BnBZR1* 在 2 个材料之间无表达上的差异(图 6B)。

2.6 胚珠败育率差异可能与 BRs 信号水平有关

最近的研究表明, BRs 对于拟南芥胚珠发生、胚珠发育和每角果粒数等多个方面具有重要影响^[9,39]。

已知拟南芥中下胚轴的缩短是 BRs-BRI1 信号下降的一个重要标志^[38,40]。为了进一步验证 C4-146 和 C4-58B 2 个系胚珠败育率的差异与 BRs 信号途径相关, 比较了 2 个系的种子在发芽过程中下胚轴的伸长情况。在播种后的 96 和 108 h, C4-58B 的下胚轴都远短于 C4-146(图 7A)。这表明, C4-58B 系的 BRs-BRI1 信号水平相对 C4-146 系要低。

在 BRs 的信号途径中, BRs-BRI1 信号水平与 BRs 合成之间存在反馈调节机制。当 BRs-BRI1 信号水平降低时, BRs 合成基因的表达会上升^[41]。因此, 检测了这 2 个系的幼苗中 3 个 BRs 合成关键基因 *BnCYP85A1*, *BnCPD* 和 *BnCYP85A2* 的表达, 结果显示, 这 3 个基因在 C4-58B 中的表达量都较 C4-146 高(图 7B)。这一结果再次表明, C4-58B 具有较 C4-146 低的 BRs-BRI1 信号水平。

3 讨论

3.1 配子体起始障碍导致的胚珠败育是限制每角果粒数的重要因素

在统计胚珠发生数的过程中, 很少观察到胚珠整体发育的异常, 如珠被或胚珠基本不发育的情况。结合早期胚珠发生数和晚期胚珠发生差异显著性分析的结果(图 1C), 推测在这 11 个系中, 除胚囊外, 胚珠的其余结构基本上都是正常发育的。尽管有报道称极核的存在并不能保证胚珠具有授粉潜能^[42], 但

是对开花当天胚珠和开花 4 天之后种子的石蜡切片观察显示, 具有极核的胚珠一般都可以完成授粉。因此推断, 在本研究所用的材料中, 具有极核的胚珠在配子分化和排列等方面也是正常的, 能完成正常的授粉。珠心细胞的程序性死亡发生在单核期之后^[28,33]。珠心的完整不退化会导致胚囊的败育^[28]。在本研究观察的材料中, 胚囊的败育主要发生在单核期之前的配子体发生起始阶段, 因此败育的胚囊一般都具有完整不退化的珠心。因此, 以极核作为胚珠具有授粉潜能的标志, 以珠心不退化作为胚珠不具有授粉潜能的标志是可靠的。

相关分析显示, 每角果粒数和正常发育胚珠百分比极显著正相关(图 4C), 和胚珠发生数未达到显著性相关(图 4B), 显示出胚珠的正常发育对于每角果粒数具有更大的贡献。尽管胚珠发生数和每角果粒数之间未达到显著性相关, 但是在胚珠正常发育百分比相同的情况下, 提高胚珠的发生数同样可以提高每角果粒数。胚珠发生数和正常发育胚珠百分比之间无相关关系(图 4A), 表明胚珠发生和发育的调控可能是两个相对独立的过程。

胚珠原基的发生数决定了每角果粒数的最大潜能, 但是胚珠原基并不一定都能够发育成具有授粉潜能的胚珠。此前也有报道认为, 胚珠的正常发育是影响油菜每角果粒数的重要因素之一, 然而先前的研究仅对一种材料进行了观察和统计, 无法揭示胚珠败育的普遍性及其在不同的材料中存在的连续性

图 7 C4-58B 中 BRs 信号途径的水平下调

A: 播种后的 96 h(A) 和 108 h(B), C4-146 和 C4-58B 幼苗生长情况; B: 幼苗中 BRs 合成关键基因的表达情况

变异^[2,10]. 本文对 DH 系中多个材料和 2 个常规栽培品种的系统研究显示, 胚珠的败育具有普遍性而且可以呈现数量性状变异. 相对于胚珠发生数, 胚珠败育比例的变异对于油菜每角果粒数差异的产生具有更大的贡献.

本研究对败育胚珠的细胞学观察, 确定了胚珠/胚囊败育的主要原因是发生在大孢子退化之后, 单核期配子体形成之前的配子体起始异常. Bouttier 和 Morgan^[2]推测, 油菜胚囊败育可能发生在减数分裂第二次分裂或功能大孢子分化阶段, 比本研究发现的时期稍早. 这可能是因为在不同材料中, 胚囊败育的时期并不相同.

3.2 每角果粒数差异的形成可能与 BRs-BRI1 信号水平的差异有关

在依赖 BRI1 的 BRs 信号路径中, BRs 被 BRI1 感知后, 经信号转导激活 BZR 家族的转录因子, 调控 BRs-BRI1 下游基因的表达^[23-26]. BRs 途径显著下调的 *pp2ab'αβ* 双突变体和 *pp2a-c3c4* 杂合双突变体表现出植株矮化、下胚轴变短的表现^[38,39]. 下胚轴变短是 BRs 信号途径下调的典型标志^[38,40], 因此, 本研究以此为标准来判断每角果粒数有差异的 2 个系的 BRs-BRI1 信号水平. 结果表明, 每角果粒数较少的系 C4-58B 中, BRs-BRI1 信号水平较低(图 7A).

在依赖 BRI1 的信号路径中, BZR1 还可以和 BRs 合成关键基因, 如 *DWF4*, *CPD* 和 *Br6ox* 的启动子区的 BRRE(BR response element)序列结合, 来反馈抑制这些基因的表达^[43]. 一般情况下, 拟南芥幼苗中 BRs 信号途径的加强, 例如, 在外施 BL(brassinolide)

的拟南芥或 *bzr1-ID* 功能获得性突变的拟南芥突变中, 上述基因的表达下调^[37,40,43]; 反之, BRs 信号途径的减弱, 如上游合成基因 *DET2* 的突变或 RNAi 干涉、去磷酸化相关基因的突变等均会使这些合成基因的表达上调^[37,38,43,44]. 本研究中, 在每角果粒数较少的 C4-58B 系中, BRs 合成的关键基因 *BnCYP85A1*, *BnCPD* 和 *BnCYP85A2* 的表达量相对于每角果粒数较多的 C4-146 的表达量高(图 7B). 这也从另外一个侧面说明 C4-58B 中的 BRs 信号途径相对 C4-146 有所减弱.

对拟南芥 BRs 缺陷型或 BRI1 信号减弱型突变体以及 BRs 超量型或 BRI1 信号增强型突变体的解剖学研究表明, BRs 在拟南芥胚珠的发生、发育和每角果粒数中起着正向调控的作用^[9,36,45]. BRs 缺陷型或 BRI1 信号减弱型突变体中, 每角果粒数的下降来自于胚珠发生、胚珠育性、种子发育等多个阶段, 且这种影响是通过 BZR1 蛋白的去磷酸化来实现的^[9]. 而且, 参与 BZR1 去磷酸化的蛋白磷酸酶 PP2A 的 C 亚基突变, 会导致部分雌配子的败育^[39]. 在本研究中, 通过下胚轴的伸长情况和 BRs 合成基因的表达情况两个方面证实了每角果粒数较少的 C4-8B 的 BRs-BRI1 信号水平相对每角果粒数较多的 C4-146 低, 与前人报道结果一致. 此外, 在每角果粒数有较大差异的这 2 个系中, BRs-BRI1 信号途径的关键转录因子 *BnBZR1* 的表达没有差异(图 6B), 说明在这两个材料中 BRs-BRI1 信号途径调控的差异可能是 *BnBZR1* 转录后调控或蛋白修饰上的差异导致的.

总之, 本研究为深入揭示每角果粒数差异形成的细胞学基础和分子机理提供了新信息, 相关结果可为油菜每角果粒数性状的育种实践提供理论支持.

参考文献

- Mendham N, Shipway P, Scott R. The effects of delayed sowing and weather on growth, development and yield of winter oil-seed rape (*Brassica napus*). J Agr Sci, 1981, 96: 389-416
- Bouttier C, Morgan D. Ovule development and determination of seed number per pod in oilseed rape (*Brassica napus* L.). J Exp Bot, 1992, 43: 709-714
- Wang X, Mathieu A, Cournède P H, et al. Stochastic models in floral biology and its application to the study of oilseed rape (*Brassica napus* L.) fertility. Third International Symposium on Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications (PMA). Beijing: IEEE, 2009. 175-182
- Charlesworth D. Why do plants produce so many more ovules than seeds. Nature, 1989, 338: 21-22
- Pechan P, Morgan D. Defoliation and its effects on pod and seed development in oil seed rape (*Brassica napus* L.). J Exp Bot, 1985, 36: 458-468

- 6 Wang X, Mathieu A, Cournède P H, et al. Variability and regulation of the number of ovules, seeds and pods according to assimilate availability in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Res*, 2011, 122: 60–69
- 7 Fukuta N, Fukuzono K, Kawaide H, et al. Physical restriction of pods causes seed size reduction of a brassinosteroid-deficient faba bean (*Vicia faba*). *Ann Bot*, 2006, 97: 65–69
- 8 Wang X, Li X, Zhang J, et al. Characterization of nine alfalfa varieties for differences in ovule numbers and ovule sterility. *Aust J Crop Sci*, 2011, 5: 447–452
- 9 Huang H Y, Jiang W B, Hu Y W, et al. BR signal influences *Arabidopsis* ovule and seed number through regulating related genes expression by BZR1. *Mol Plant*, 2013, 6: 456–469
- 10 Pechan P M. Ovule fertilization and seed number per pod determination in oil seed rape (*Brassica napus*). *Ann Bot*, 1988, 61: 201–207
- 11 刘后利. 实用油菜栽培学. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 166–167
- 12 Yano M. Genetic and molecular dissection of naturally occurring variation. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 130–135
- 13 危文亮. 甘蓝型油菜长角果变异体的遗传研究. *遗传*, 2000, 22: 93–95
- 14 酃美娟, 顾菊生. 油菜农艺性状的基因效应分析. *浙江农业学报*, 1992, 4: 149–153
- 15 Zhang L, Liu P, Hong D, et al. Inheritance of seeds per silique in *Brassica napus* L. using joint segregation analysis. *Field Crops Res*, 2010, 116: 58–67
- 16 Radoev M, Becker H C, Ecke W. Genetic analysis of heterosis for yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus* L.) by quantitative trait locus mapping. *Genetics*, 2008, 179: 1547–1558
- 17 Shi J, Li R, Qiu D, et al. Unraveling the complex trait of crop yield with quantitative trait loci mapping in *Brassica napus*. *Genetics*, 2009, 182: 851–861
- 18 Zhang L, Yang G, Liu P, et al. Genetic and correlation analysis of silique-traits in *Brassica napus* L. by quantitative trait locus mapping. *Theor Appl Genet*, 2011, 122: 21–31
- 19 Zhang L, Li S, Chen L, et al. Identification and mapping of a major dominant quantitative trait locus controlling seeds per silique as a single Mendelian factor in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 695–705
- 20 Pérez-España V H, Sánchez-León N, Vielle-Calzada J P. CYP85A1 is required for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 321
- 21 Wang Z Y, Seto H, Fujioka S, et al. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, 2001, 410: 380–383
- 22 Hu Y X, Wang Y H, Liu X F, et al. *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Res*, 2004, 14: 8–15
- 23 Gendron J M, Wang Z Y. Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 436–441
- 24 Kim T W, Guan S, Sun Y, et al. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 1254–1260
- 25 Sun Y, Fan X Y, Cao D M, et al. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2010, 19: 765–777
- 26 Tang W, Deng Z, Wang Z Y. Proteomics shed light on the brassinosteroid signaling mechanisms. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 27–33
- 27 Smyth D R, Bowman J L, Meyerowitz E M. Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1990, 2: 755–767
- 28 Papini A, Mosti S, Milocani E, et al. Megasporogenesis and programmed cell death in *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Protoplasma*, 2011, 248: 651–662
- 29 Schulz P, Jensen W A. Prefertilization ovule development in *Capsella*: the dyad, tetrad, developing megaspore, and two-nucleate gametophyte. *Can J Bot*, 1986, 64: 875–884
- 30 Reiser L, Fischer R L. The ovule and the embryo sac. *Plant Cell*, 1993, 5: 1291
- 31 Webb M C, Gunning B E. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. *Sex Plant Reprod*, 1990, 3: 244–256
- 32 杨维才, 石东乔. 植物雌配子体发育研究进展. *植物学通报*, 2007, 24: 302–310
- 33 Christensen C A, King E J, Jordan J R, et al. Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the *Gf* mutant. *Sex Plant Reprod*, 1997, 10: 49–64
- 34 Van Went J, Cresti M. Pre-fertilization degeneration of both synergids in *Brassica campestris* ovules. *Sex Plant Reprod*, 1988, 1: 208–216
- 35 Acosta-García G, Vielle-Calzada J P. A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16: 2614–2628
- 36 Kim T W, Hwang J Y, Kim Y S, et al. *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 2005, 17: 2397–2412

- 37 Goda H, Shimada Y, Asami T, et al. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1319–1334
- 38 Tang W, Yuan M, Wang R, et al. PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 124–131
- 39 Ballesteros I, Domínguez T, Sauer M, et al. Specialized functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2013, 73: 862–872
- 40 Wang Z Y, Nakano T, Gendron J, et al. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell*, 2002, 2: 505–513
- 41 Bancoş S, Nomura T, Sato T, et al. Regulation of transcript levels of the *Arabidopsis* cytochrome P450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 2002, 130: 504–513
- 42 Pischke M S, Jones L G, Otsuga D, et al. An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15800–15805
- 43 He J X, Gendron J M, Sun Y, et al. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, 2005, 307: 1634–1638
- 44 Chung H Y, Fujioka S, Choe S, et al. Simultaneous suppression of three genes related to brassinosteroid (BR) biosynthesis altered campesterol and BR contents, and led to a dwarf phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 397–402
- 45 Nole-Wilson S, Rueschhoff E E, Bhatti H, et al. Synergistic disruptions in *seuss cyp85A2* double mutants reveal a role for brassinolide synthesis during gynoecium and ovule development. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 198

Cytological Basis and Molecular Mechanism of Variation in Number of Seeds Per Pod in *Brassica napus*

LI YongPeng, CHENG Yan, CAI GuangQin, FAN ChuChuan & ZHOU YongMing

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

The number of seeds per pod in *Brassica napus* shows great variation among different cultivars, lines and germplasm resources. Studies on this trait are important in increasing rapeseed yield by utilizing advantageous variations. In this study, we revealed the cytological basis and molecular mechanism of the formation of variation in number of seeds per pod in *Brassica napus* through analyzing a series of doubled haploid lines and cultivars. The results showed that a part of ovule primordia could not develop into mature seeds because they had encountered abortion during the development process. The percentage of normally developed ovules was an important determinant of variation in number of seeds per pod. Cytological analyses concluded that the abortion of ovule occurred between the stages of megaspore degradation and uninucleate gametophyte. Our results also showed that the variation in the rate of ovule abortion is related to the differences in the regulation level of BRS-BRI1 signaling pathway in *Brassica napus*.

***Brassica napus*, number of seeds per pod, doubled haploid line, ovule development, BRs**

doi: 10.1360/052014-87