

王杰利, 陈 盛, 付正莉, 等. 营养分配调节对甘蓝型油菜种子大小的影响及其机制[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 759-762.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.007

营养分配调节对甘蓝型油菜种子大小的影响及其机制

王杰利¹, 陈 盛¹, 付正莉¹, 王宁宁¹, 刘 蕊¹, 陈 松², 王 政¹, 张志燕¹,
谭小力¹

(1. 江苏大学生命科学研究院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 采用去除侧枝人为调节营养分配的方法, 探究影响油菜种子大小的机理。结果表明, 通过营养分配调节, 主花序种子千粒质量最多提高了 1 倍; 对种子胚子叶细胞进行超微结构观察, 发现种子细胞明显增大, 细胞中油体的面积也相应增加。因此推测可以通过去除油菜侧枝的方法进行营养调节, 增加种子大小; 虽然油菜种子的含油量没有变化, 但种子中油脂的绝对量随种子质量的增加而增加。

关键词: 甘蓝型油菜; 种子大小; 侧枝; 营养; 油体

中图分类号: S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0759-04

Seed size of lateral branches-removed *Brassica napus* and its cytological mechanism

WANG Jie-li¹, CHEN Sheng¹, FU Zheng-li¹, WANG Ning-ning¹, LIU Rui¹, CHEN Song², WANG Zheng¹,
ZHANG Zhi-yan¹, TAN Xiao-li¹

(1. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The seed size, 1 000-seed weight, and seed oil content of lateral branches-removed *Brassica napus* were measured to investigate the effect of artificial nutrient partitioning. The 1 000-seed weight of main inflorescence was doubled by lateral branches removal. The ultrastructure observation of seed cotyledon cells revealed that the seed cell volume and the total area of oil body were enlarged. Although seed relative oil content was not influenced by branches removal, the enlarged seed and increased seed weight led to the elevated amount of absolute seed oil content.

Key words: *Brassica napus* L.; seed size; lateral branch; nutrition; oil body

油菜是中国重要的油料作物, 中国油菜的种植面积占世界油菜种植总面积的 30% 左右, 菜籽油占中国食用油市场的 40% 以上^[1]。种子大小对种子的萌发与幼苗的生长具有重要影响^[2]。种子大小

也是重要的农艺性状, 是影响农作物产量的重要因素之一^[3]。提高油菜种子大小对油菜产量以及食用油的供给有重要意义。

对种子大小的研究主要集中在拟南芥和水稻中, 利用突变体进行遗传学方面的研究。种子大小受很多途径的调节, 如泛素介导的蛋白酶体降解途径、植物激素途径和 G 蛋白信号途径等^[4]。泛素介导的蛋白酶体降解途径是一种非常保守的途径, 在拟南芥中, 编码泛素受体蛋白 DA1 基因 *DA1* 突变

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31271760, 31471527)

作者简介: 王杰利(1990-), 男, 安徽淮北人, 硕士研究生, 研究方向为油菜生物技术。(E-mail) jerrywang@foxmail.com

通讯作者: 谭小力, (E-mail) xltan@ujs.edu.cn.

后,得到比野生型大的种子^[5]。此外,*DA1* 增强子(EOD1)编码的 E3 泛素连接酶的突变,协同增强种子的大表型^[6]。拟南芥中 *DA2* 和 水稻中 *KING* 型 E3 泛素连接酶为同系物,当在拟南芥中过量表达 *DA2* 或在水稻中过量表达 *GW2* 时得到比野生型小的种子^[7]。说明泛素介导的蛋白酶体降解途径在拟南芥和在水稻中调节种子大小的机制是相似的。细胞分裂素(CTK)、细胞生长素(IAA)以及油菜素内酯(BR)等植物激素也参与种子大小的调节。在拟南芥中,大种子的产生主要通过降低 CTK 水平,或者破坏 CTK 信号的传递^[4,8]。在水稻中,一个编码 CTK 和氧化酶/脱氢酶 *OsCKX2* 的主要数量性状位点 *Gn1a* 发生突变,引起 CTK 在花序分生组织中积累,从而引起器官增大。然而,在拟南芥中过量表达 *AtCKX1* 和 *AtCKX3* 时,种子质量得到了明显提升。这种在水稻和拟南芥中不同的表现形式,可能是由于 CTK 在两个物种中调节分生组织再生的机制不同所导致的^[4,9-10]。IAA 几乎参与植物生长发育的各个方面。在水稻中,*TGW6* 是一个控制谷粒大小的 QTL,它编码一个生长素-葡萄糖水解酶,在胚乳发育过程调节 IAA 的稳态^[11]。在拟南芥中,当 *MNT* 发生突变,导致珠被细胞过度分裂,从而使种皮增大,种子也明显增大^[4,12]。水稻中矮小突变体 *d11* 是典型的 BR 缺陷型,它矮小,叶子直立,种子小而圆。拟南芥中 BR 缺陷突变体(*det2*)的种子明显变小^[4,13]。在水稻矮小突变体中 *d1* 突变体表现为对赤霉素(GA)和 BR 不敏感^[14],而且产生较野生型更小的谷粒^[4,15]。

油菜是典型的异源四倍体,尽管通过育种技术可以得到籽粒较大的品种,但很难利用在拟南芥或水稻研究中比较成熟的图位克隆技术获得控制种子大小的基因,因而对油菜种子增大的机理还不甚了解。本试验通过去除侧枝调节营养供给的方法,探究影响油菜种子大小的机理,并对种子胚子叶细胞进行超微结构观察,分析种子变大的原因,从而为油菜种子大小的研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

油菜品种为宁油 12,所用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 侧枝的去除 在试验田纯种宁油 12 圃内选择优良单株 100 株,于油菜即将开花时剪掉侧枝,定期检查并及时去除新出侧枝。待长出荚果后每隔 1 d 观察一次种子发育情况,并在授粉后每隔 10 d 进行一次取样拍照,直至种子完全成熟。成熟后,单株收种,分别脱粒保存备用。

1.2.2 千粒质量统计 单株种子晒干后,随机挑取 30 株平均分成 5 组,每组 6 株。每株随机挑选 1 000 粒种子进行称量计数,每株 5 个重复。

1.2.3 种子胚子叶电镜切片制备 将种子在 ddH₂O 中室温浸泡过夜,去除种皮,将胚子叶切成约 2 mm×2 mm 大小的小块,于 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH=7.2)配制的 2.5%戊二醛固定液中,4℃冰箱中固定 2 d,用相同缓冲液洗涤 3 次,再以 1%四氧化锇(缓冲液同前)在室温固定 2.5 h。四氧化锇固定后,用 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH=7.2)洗涤 3 次,乙醇逐级脱水,Spurr's 树脂渗透和包埋,60℃聚合 2 d,获得样品包埋块,干燥器中保存备用。将切过半薄切片的包埋块进一步修块,用钻石刀在超薄切片机上切取厚度约 70 nm 的超薄切片,经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后,在 Philips Tecnail 12 透射电子显微镜下观察,用附带的 CCD 成像系统拍照^[16]。

1.2.4 种子含油量的测定 种子含油量采用近红外的方法进行测定。将待测的干燥种子分装 5 g 每包,每组 3 个重复。然后用近红外仪分别测量。

2 结 果

2.1 去除侧枝处理对油菜种子体积与千粒质量的影响

通过对照试验发现去除侧枝的油菜和未去除侧枝的油菜生长状态没有明显差异,而种子大小有明显变化。如图 1 所示,授粉后 60 d 去除侧枝处理的油菜种子体积明显大于未去除侧枝对照。去除侧枝的 5 组(NY12-1、NY12-2、NY12-3、NY12-4、NY12-5)千粒质量与对照组(NY12)相比,千粒质量极显著增加($P<0.01$)(图 2)。

2.2 去除侧枝处理对油菜种子胚子叶细胞超微结构的影响

对比去除侧枝处理和未去除侧枝对照的油菜种子胚子叶细胞超微结构(图 3),可以发现在相同视

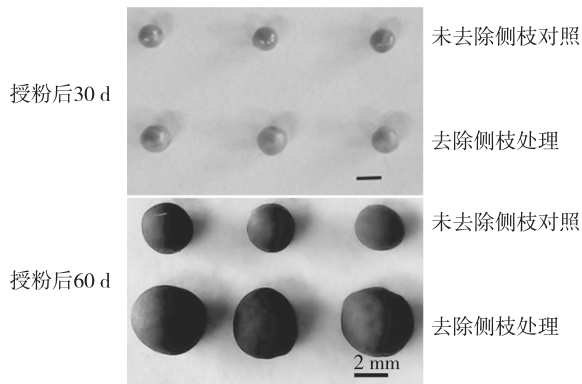
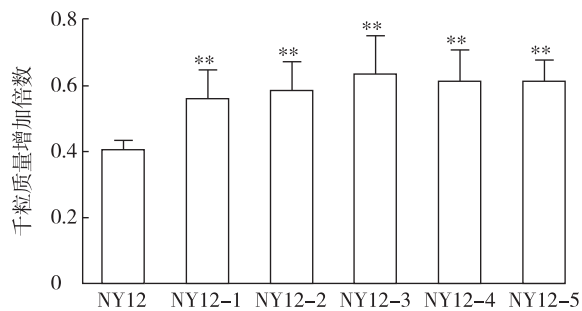


图1 去除侧枝后油菜主花序种子体积变化

Fig.1 The change of rape seed size of main inflorescence after lateral branches removal



NY12: 宁油 12(对照); NY12-1~NY12-5-6: 宁油 12 单株(去除侧枝处理)。

图2 去除侧枝后油菜主花序种子千粒质量变化

Fig.2 The change of 1 000-seed weight of rapeseed main inflorescence after lateral branches removal

野里(放大 700 倍)对照 NY12 中出现 2 个胚子叶细胞,而去除侧枝处理 NY12-1 和 NY12-2 中仅出现 1 个,因此初步判断去除侧枝的油菜种子胚子叶细胞

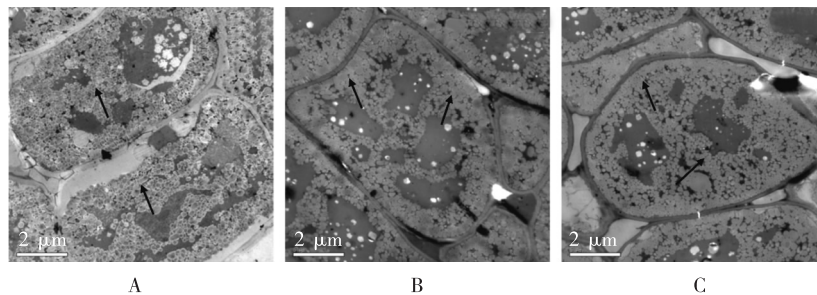
大于未去除侧枝对照的种子胚子叶细胞。对细胞内的油体进行统计,发现去除侧枝与否对油体大小没有明显影响。对整个细胞的油体面积,及视野内完整细胞的面积进行统计,发现去除侧枝的油菜种子胚子叶细胞油体总面积较对照明显增加,细胞总面积也明显增加(图 4)。

2.3 去除侧枝对油菜种子含油量的影响

由于去除侧枝处理的种子胚子叶细胞中总油体面积明显增加,因此对油菜种子的含油量进行了测量。结果显示,对照 NY12 的含油量为 39.04%,去除侧枝处理含油量为 37.64%~40.09% (平均值为 38.81%),较对照含油量下降 0.23 个百分点,差异不明显。虽然,去除侧枝处理的油菜种子含油量没有明显变化,但由于种子体积与质量的增加,所含油脂的绝对量也相应增加了。

3 讨论

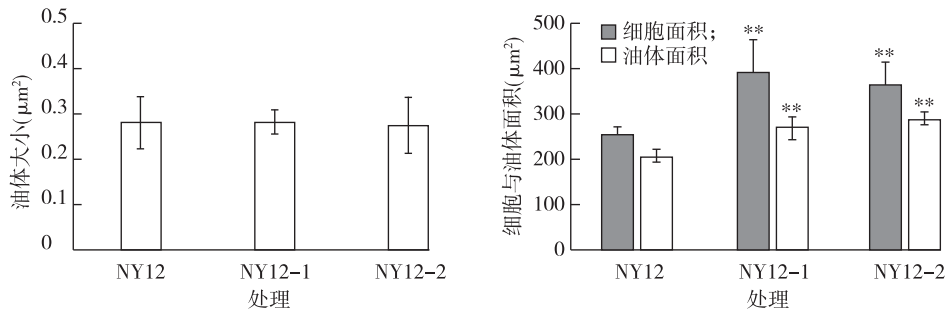
去除侧枝处理的油菜种子明显大于未去除侧枝对照,推测可能是由于去除侧枝后光合积累的营养集中储存在主枝种子中,从而使种子体积增大。通过对油菜种子胚子叶细胞超微结构的观察以及种子含油量的测定,发现经去除侧枝调节营养分配获得的大种子可能是由于细胞增大而不是细胞增多而引起的。油菜种子大小及产量不仅受到遗传因素的调控,还受到环境因素的影响。油菜是一种异源四倍体作物,获得突变基因的方法不如拟南芥及水稻简单快捷,因此对其基因功能的研究受到一定限制。本试验中种子增大是由于细胞增大引起,在拟南芥突变体中种子增大的机理普遍是由于细胞增多而引起。本试验中种子增大机制的研究途径与前人不同,通过深入研究这种机制,可能寻找到控制油菜种



A: 未去除侧枝对照 NY12; B: 去除侧枝处理 NY12-1; C: 去除侧枝处理 NY12-2。黑色箭头指示油体。

图3 油菜胚子叶细胞超微结构(×700)

Fig.3 The cotyledon cell ultrastructure in rapeseed (×700)



NY12: 未去除侧枝对照; NY12-1、NY12-2: 去除侧枝处理单株。* * 表示与对照相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

图4 去除侧枝后油菜主花序种子胚子叶细胞以及胚子叶细胞中油体面积

Fig.4 The cotyledon cell size and the total area of oil body in rapeseed main inflorescence after lateral branches removal

子大小的新途径,进而为培育高产油菜品种提供新的理论依据。

参考文献:

- [1] 沈金雄,傅廷栋. 我国油菜生产、改良与食用油供给安全[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(1): 1-8.
- [2] 田叶飞,魏佑营,常晓轲,等. 黄瓜、西瓜与南瓜种子大小对萌发期及幼苗质量的影响[J]. 山东农业科学, 2012, 44(8): 40-42.
- [3] 郭陞垚,陈剑洪,王金线,等. 花生种子大小对产量及品质的影响[J]. 福建农业学报, 2012, 27(7): 700-706.
- [4] ZUO J, LI J. Molecular genetic dissection of quantitative trait loci regulating rice grain size[J]. Annu Rev Genet, 2014, 48(1): 99-118.
- [5] LI Y, ZHENG L, CORKE F, et al. Control of final seed and organ size by the DA1 gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Genes & Development, 2008, 22(10): 1331-1336.
- [6] FANG W, WANG Z, Cui R, et al. Maternal control of seed size by EOD3/CYP78A6 in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2012, 70(6): 929-939.
- [7] XIA T, LI N, DUMENIL J, et al. The ubiquitin receptor DA1 interacts with the E3 ubiquitin ligase DA2 to regulate seed and organ size in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2013, 25(9): 3347-3359.
- [8] DENG Y, DONG H, MU J, et al. *Arabidopsis* histidine kinase CKII acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth [J]. The Plant Cell, 2010, 22(4): 1232-1248.
- [9] MING L, DING T, WANG K, et al. Mutations in the F-box gene LARGER PANICLE improve the panicle architecture and enhance the grain yield in rice [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(9): 1002-1013.
- [10] WERNER T, MOTYKA V, LAUCOU V, et al. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity [J]. Plant Cell, 2003, 15(11): 2532-2550.
- [11] ISHIMARU K, HIROTSU N, MADOKA Y, et al. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene TGW6 enhances rice grain weight and increases yield [J]. Nature Genetics, 2013, 45(6): 707-711.
- [12] SCHRUFF M C, MELISSA S, SUSHMA T, et al. The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs [J]. Development, 2006, 133(2): 251-261.
- [13] WEN-BO J, HUI-YA H, YU-WEI H, et al. Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2013, 162(4): 1965-1977.
- [14] ASHIKARI M, YOSHIMURA A. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene dwarf 1 encodes the α -subunit of GTP-binding protein [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 1999, 96(18): 10284-10289.
- [15] YUKI I, YOSHIYUKI T, NORIKO I, et al. Function and expression pattern of the α subunit of the heterotrimeric G protein in rice [J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51(2): 271-281.
- [16] 韦存虚,钦风凌,李爱民,等. 油菜种子油体的观察和大小分析 [J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(4): 445-448.

(责任编辑:张震林)