

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2021.50506

常金慧, 潘健, 姜欢利, 林文慧. *AtMES1* 正调控拟南芥角粒数[J]. 植物科学学报, 2021, 39(5): 506~514Chang JH, Pan J, Jiang HL, Lin WH. *AtMES1* positively regulates seed number per siliques in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. *Plant Science Journal*, 2021, 39(5): 506~514

AtMES1 正调控拟南芥角粒数

常金慧¹, 潘健², 姜欢利¹, 林文慧^{1*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 基于拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)单角果种子数量(角粒数)的全基因组关联分析(GWAS)数据, 筛选到一个可能影响角粒数的候选基因*AtMES1*, 并对其表达模式和转录组数据进行了分析。结果显示, *AtMES1*的表达模式分析结果表明其在心皮和花序处等特异性表达。分析该基因T-DNA插入突变体的表型发现其角粒数比野生型对照显著下降。转录组分析结果表明, 参与调控胚珠发生和发育的多个重要基因在缺失突变体中表达下调。同时使用胎座特异启动子使*AtMES1*在雌蕊中过量表达, 发现转基因植株的角果长度变短, 但种子密度显著增加, 原因可能是通过激活植物激素相关通路, 从而调控胚珠发生和发育相关基因表达正调控角粒数。研究结果初步证实了*AtMES1*具有正调控拟南芥角粒数和种子密度的功能。

关键词: *AtMES1*基因; 角粒数; 种子密度; 转录组测序

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2021)05-0506-09

***AtMES1* positively regulates seed number per siliques in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh**

Chang Jin-Hui¹, Pan Jian², Jiang Huan-Li¹, Lin Wen-Hui^{1*}

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: According to our previous genome-wide association analysis (GWAS) and prediction of gene expression, we identified *AtMES1* as a potential gene that may participate in regulating seed number per siliques (SNS). We identified the loss-of-function mutants of *AtMES1* and analyzed their phenotypes. *AtMES1* had significantly reduced SNS and seed density compared with the wild-type control. Transcriptomic analysis revealed that multiple important genes involved in hormone-related ovule initiation and development were down-regulated, suggesting that *AtMES1* positively regulated SNS by modulating hormone signals. The ectopic expression of *AtMES1* by placenta-specific promoter STK led to shorter siliques but significantly increased seed density, further demonstrating that *AtMES1* positively regulated ovule initiation and seed density. In conclusion, our study suggests that *AtMES1* is a new positive regulator of *Arabidopsis* ovule initiation and SNS.

Key words: *AtMES1*; Seed number per siliques (SNS); Seed density; Transcriptome sequencing

收稿日期: 2021-03-09, 修回日期: 2021-05-14。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771591, 32070342); 上海交通大学农工交叉基金项目(Agri-X20200204)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31771591, 32070342) and Agri-X Interdisciplinary Fund of Shanghai Jiao Tong University (Agri-X20200204).

作者简介: 常金慧(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物发育生物学(E-mail: changjh0209@sjtu.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: whlin@sjtu.edu.cn)。

种子是种子植物特有的繁殖器官，很多农作物如水稻(*Oryza sativa* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、大豆(*Glycine max*(L.) Merrill)、油菜(*Brassica napus* L.)等都以种子作为收获物^[1]。种子数量和重量是直接决定这些农作物产量的关键性状，在不影响育性和种子重量的情况下，增加种子数量是增加种子产量的有效途径。与种子发育和种子重量相比，种子数量的调控机制系统研究相对较少，尤其是双子叶作物。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)是十字花科的一种模式植物，可作为双子叶作物的模式材料研究种子数量调控机制，拟南芥的种子数量由角果数量和单角果种子数(角粒数)决定^[2]。

角果数由受精的花的数量决定，而角粒数取决于很多因素，包括：花器官发育、胚珠决定、胚珠原基起始、胚珠发育、雌雄配子发育、双受精过程以及合子发育等，并且每个过程都受到不同信号通路的调控^[3-8]。角粒数的最大值取决于胚珠数，而胚珠数的最大值取决于胚珠原基数，胚珠原基的数量取决于胚珠决定和胚珠原基的起始过程。研究表明，很多因素通过调控雌蕊大小或者胚珠起始过程来影响胚珠原基数量，进而很大程度上决定了角粒数，如调控花器官发育的 MADS 基因^[9]，植物激素^[10-14]和环境因素^[15, 16]等。

拟南芥花发育包括 20 个时期，其中胚珠起始和发育集中在花发育的 9~12 期，胚珠原基起始于心皮边缘分生组织，主要在第 9 期不同时起始^[4, 17-20]。花器官发育通过 ABCDE 模型中不同 MADS 基因进行调节，其中 C 基因单独决定心皮的形成，D 类基因包括 *SEEDSTICK* (*STK*)、*SHATTERPROOF1* (*SHP1*)、*SHATTERPROOF1* (*SHP2*)^[9, 21] 等调控胚珠的决定和起始。研究发现 *STK* 与 *SHP1* 和 *SHP2* 对胚珠的发育是必须的，它们单独或者同时突变会使胚珠和种子发育受阻，部分胚珠转化成叶状或心皮状组织^[22]。*E* 类基因包括 *SEPALLATA* (*SEP*)。ABCDE 基因与 E 类基因联合表达可以使叶片转化成完整的花器官^[23]。

我们实验室的前期工作证明油菜素甾醇(BR)通过转录因子 BZR1 直接或间接调节胚珠早期发育相关基因 *ANT*、*HLL* 和 *AP2* 的表达，从而正调控角粒数。与野生型相比，BR 信号增强突变体 *bzr1-1D* 具有胎座长、胚珠数目增加、角粒数增加

的表型。相反，BR 缺失和不敏感突变体 *det2*、*bri1* 和 *bin2-1* 具有胎座短、胚珠数目少、角粒数减少的表型^[24]。细胞分裂素(CKs)正调控胚珠起始，细胞分裂素脱氢酶(cytokinin dehydrogenase, CKX)是催化细胞分裂素降解的酶，*ckx3* *ckx5* 双突变体表现较长的雌蕊，并且胚珠数目几乎是野生型的 2 倍^[10]。生长素与植物侧生器官的发生、胚珠起始和胚珠发育等多个植物生理过程有关^[14, 25-27]。有研究已经证实拟南芥胚珠发育过程中生长素极性输出蛋白 PIN1 是介导生长素积累的一种非常重要的因子。*pin1-5* 是 *PIN1* 的一个弱的突变体胚珠，它的胚珠原基数量减少，胚珠数目平均 9 个左右^[11, 27]。PIN1 的极性分布和生长素响应最大值与胚珠不同时起始过程密切相关^[4]，PIN1 正调控角粒数。

前期研究中，我们通过全基因组关联分析(genome-wide association analysis, GWAS)，以拟南芥 107 个生态型为材料，鉴定出 38 个最重要的 SNPs 位点，筛选出来了数十个候选基因^[28]。本研究以上述结果为基础，结合基因表达，选择其中一个候选基因 *AtMES1* 进行功能验证。*AtMES1* 编码一种蛋白质，该蛋白质在体外具有羧酸酯酶活性、水杨酸甲酯酯酶活性、茉莉酸甲酯酯酶活性和 IAA 甲酯酯酶活性^[29]，主要在拟南芥心皮、花序等处表达。功能研究发现 *AtMES1* 正调控角粒数，本研究通过转录组分析得到了一些参与胚珠原基起始过程与角粒数调控的候选基因和信号，以期为提高双子叶作物的产量研究提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为拟南芥 Columbia 生态型 (Col)，为本实验室所保存。购入 SALK 研究所 (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) Col 背景下的拟南芥 T-DNA 插入突变体 *Atmes1-1* (SALK_056974.50.75.x) 和 *Atmes1-2* (SALK_139873.50.45.x)。将拟南芥干燥种子在超净台中使用 10% 次氯酸钠震荡灭菌 5 min，采用无菌水冲洗 5 次，之后播种在 1/2 MS 培养基中。于 4℃、黑暗条件下放置 48 h，春化后转移至(23℃, 16 h 光照/8 h 黑暗)恒温光照培养箱中培养 7 d，将幼苗移入土中，于 23℃, 16 h 光照/8 h 黑暗温室种

植。农杆菌感受态 GV3101 及大肠杆菌感受态 *E. coli* DH5 α 购于上海唯地生物技术有限公司。表达载体载体 pBI101.3 为本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 角粒数、角果长度和种子密度统计

选择 Col 突变体纯合株系和过表达株系各 5~10 株长势一致的单株，在角果变黄之前，使用体式镜(Leica DFC290)拍摄第 5~20 个(从根部往上数)角果，并使用镊子和针头将角果解剖，统计其种子数目，利用 Image J 软件测量角果长度，计算相应的种子密度。

1.2.2 基因克隆和载体构建

从 TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>)网站获得 *STK* 的启动子序列和 *AtMES1* 的 gDNA 序列，根据该序列和载体序列，设计 pSTK-XbaI-F、pSTK-XbaI-R 及 AtMES1-F/R 引物序列(表 1)，以 Col 的全基因组为模板，使用 KOD 高保真酶扩增，用 DNA 回收试剂盒(天根)回收、纯化 DNA，利用酶切连接法将 proSTK 连接到 pBI101.3 载体上并测序，测序结果正确的重组质粒用 *Sma*1 限制性核酸内切酶酶切后，回收纯化酶切条带，并与扩增出来的带有 *Sma*1 酶切位点的 *AtMES1* 目的基因连接、测序，最终得到重组质粒 pSTK :: AtMES1-GUS。

1.2.3 农杆菌侵染拟南芥

将得到的重组质粒转入农杆菌中，挑取 pSTK :: AtMES1-GUS 阳性单克隆，将含有 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 的卡那霉素的 2 mL 液体 YEP 放置于 28℃ 和 200 rpm 摆床中培养 10 h，再转入 200 mL 含有 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 的卡那霉素的液体 YEP 中放置于摇床中培养 10 h。收集农杆菌并用含有 0.02% (V/V) Silwet L-77 的 pH 5.7 的 5% 蔗糖溶液将农杆菌稀释至 OD₆₀₀ 值处于 0.8~1.0。将 Col 的拟南芥花序浸入该缓冲液 1 min，密封黑暗中培养 16 h 以上，第 2 d 用清水将农杆菌清洗干净。4 d 后侵染第 2 次，侵染步骤与第一次一致。等到植株果荚变黄，收集种子。

1.2.4 筛选转基因阳性苗

待种子干燥后，使用 10% 的次氯酸钠震荡灭菌 5 min，无菌水冲洗 5 次，之后播种在含有 50 mg/L 卡那霉素的 1/2 MS 培养基中。于 4℃，黑暗条件下放置 48 h，春化后转移至恒温光照培

养箱中(23℃，16 h 光照/8 h 黑暗)培养 7 d，筛选出来有根扎入培养基的幼苗移入土中，于 23℃，16 h 光照/8 h 黑暗温室种植。

1.2.5 突变体株系的鉴定

根据突变体的信息，在 *AtMES1* 基因上、下游设计自身引物 AtMES1-FP/RP，并在两个突变体插入位点的下游设计特定的 3' 端引物 AtMES1-1-RP、AtMES1-2-RP，T-DNA 的边界引物 LB(表 1)，进行突变体株系的鉴定。

1.2.6 过表达株系的鉴定

根据载体序列设计引物 AtMES1-OX-F 和 GUS-R(表 1)，进行 AtMES1-OX 过表达株系的鉴定。

1.2.7 总 RNA 的提取和反转录 cDNA

采集拟南芥 Col、AtMES1 突变体株系和 AtMES1-OX 过表达株系新鲜花序，利用 Trizol 法提取 RNA，并反转录合成 cDNA，用于基因表达分析。

1.2.8 荧光定量 RT-PCR 基因表达分析

将 1.2.7 所得到的 cDNA，使用实时定量 PCR 仪器(德国耶拿公司)进行扩增，以 *AtACTIN* 作为内参基因，用 2^{-ΔΔCT} 法分析基因的相对表达(表 1)。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
pSTK-XbaI-F	GCAGGTCGACTCTAGAGCTCTG-CAATTACCTTTTC
pSTK-XbaI-R	CCGGGGATCCTCTAGACCTTCATTTAACATCAAAC
AtMES1-F	GTCAGAGGATCCCCGGGATGAGT-GAGGAAAGAGGAACA
AtMES1-R	GGACTGACCGTACCCGG-GAACGAATTGTCCCGCAT
AtMES1-OX-F	CTCCAGTTGAGGATCTTGAAC
GUS-R	TTCGTTGTCACACAAACG
QRT-AtMES1-F	AACTTCTCGGATGAAGGATATG
QRT-AtMES1-R	ATCACTGAGTTGCTGAGGCT
QRT-AtACTIN-F	CCTTCGTCTTGATCTGCGG
QRT-AtACTIN-R	AGCGATGGCTGAAACAGAAC
AtMES1-FP	GAATTAGCGCATGTAAGATTGCG
AtMES1-RP	CGATCCTGGCCTCATAAAAA
AtMES1-1-RP	CCATATCCTCATCCGAGAAGT
AtMES1-2-RP	TCGATGATCCCAGAACGACT
LB	ATTTGCCGATTCGGAAC

1.2.9 转录组材料收集

在体式显微镜(Leica DFC290)下, 使用镊子和针头去除萼片和花瓣, 取9~10时期的雌蕊进行转录组测序分析。

1.2.10 数据分析

将得到的数据利用SPSS 21.0软件进行方差分析, 并标注差异显著性。利用GraphPad Prism 7软件作图。

2 结果与分析

2.1 AtMES1 突变体株系的鉴定

本研究从拟南芥突变体库(<https://abrc.osu.edu/>)中获得了AtMES1的两个相关突变体(图1: a), 并对AtMES1突变体株系进行鉴定。基因型鉴定结果表明, 使用自身引物AtMES1-FP/RP均

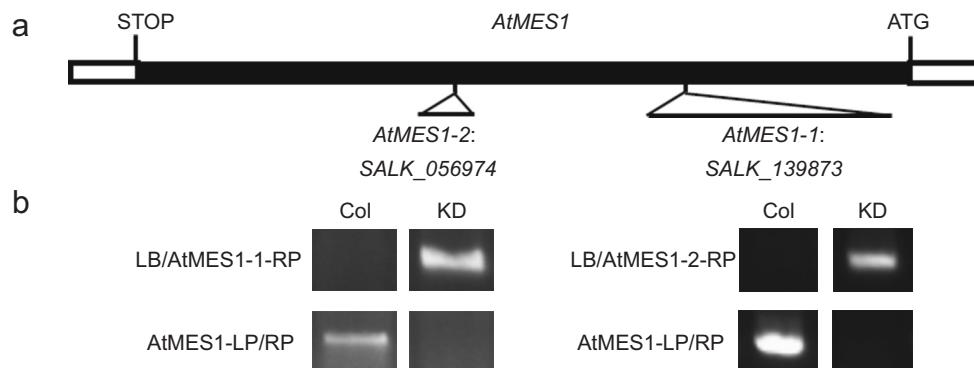
无扩增条带, 使用特定的后端引物和LB扩增时均有条带(图1: b), 说明这两个突变体株系的T-DNA序列均插入在AtMES1的基因序列中, 均为纯合体, 并且T-DNA为正向插入, 将两个突变体株系分别命名为Atmes1-1和Atmes1-2。

2.2 突变体株系基因表达分析

基因表达水平的qRT-PCR分析结果显示(图2), 与野生型相比, Atmes1-1和Atmes1-2两个突变体株系的AtMES1基因表达量极显著降低($P < 0.01$), 说明这两个突变体植株是AtMES1的有效突变体。

2.3 Atmes1-1和Atmes1-2突变体株系表型分析

本研究对突变体株系的角果长度、角粒数和种子密度进行了研究。统计分析结果表明, 与野生型相比, AtMES1的角果长度没有明显变

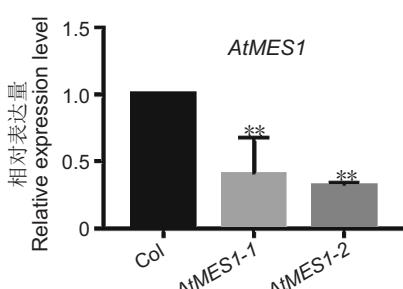


a: T-DNA 插入的 AtMES1 突变体的结构图。白色框代表 UTR, 黑色框代表 AtMES1 基因, 三角形代表 T-DNA 插入 AtMES1 基因的位置。b: PCR 扩增核酸琼脂糖凝胶电泳图, KD 表示突变体株系。

a: Figure shows location of transfer DNA (T-DNA) insertion in gene, white box represents UTR, black box represents AtMES1 gene, and triangle represents position where T-DNA is inserted into AtMES1. b: Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified nucleic acid, KD represent mutant lines.

图1 AtMES1 纯合 T-DNA 插入突变体的鉴定

Fig. 1 Identification of homozygous T-DNA insertion knockdown (KD) line



AtMES1突变体中AtMES1基因表达量与野生型比对结果, 误差线代表SD。“**”表示 $P < 0.01$ 。下同。Gene expression level of AtMES1 in AtMES1 mutant compared with that in wild-type. Error bar represents SD. “**” indicates $P < 0.01$. Same below.

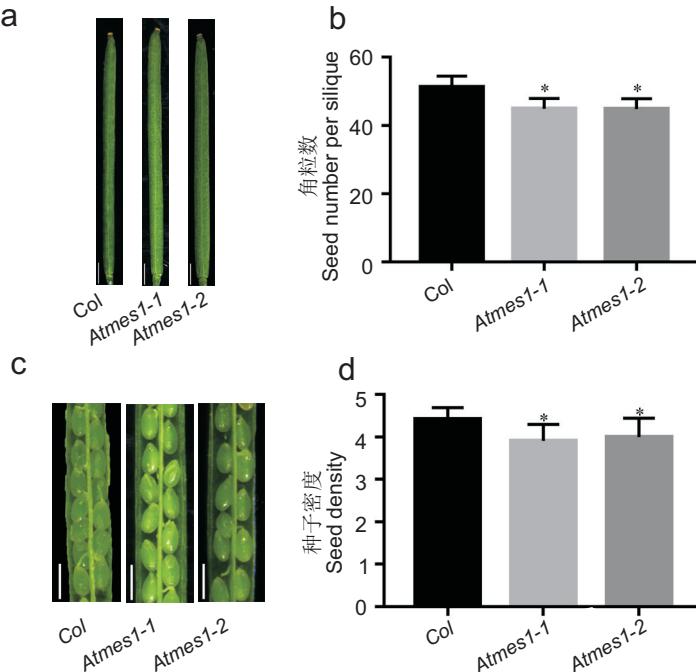
图2 AtMES1 突变体株系的基因表达量

Fig. 2 qRT-PCR of AtMES1 genes in AtMES1 mutant lines

化(图3: a), 但突变体的角粒数显著($P < 0.05$)低于野生型(图3: b)。进一步观察发现, 与野生型相比, 突变体的种子排列较为稀疏(图3: c), 统计分析结果发现突变体的种子密度(单位长度的角果里的种子数量)比野生型显著降低(图3: d)。以上结果说明AtMES1正调控拟南芥角粒数和种子密度。

2.4 AtMES1 突变体株系转录组测序分析

与野生型相比, AtMES1突变体具有角粒数降低, 种子密度降低的表型。进一步观察发现, AtMES1的角果中没有败育的胚珠和种子, 表明AtMES1不影响种子育性, 由此可推断突变体的胚



a: Col 和 Atmes1-1、Atmes1-2 突变体株系角果(标尺为 1 mm)。b: Col 和 Atmes1-1、Atmes1-2 突变体株系角粒数。c: Col 和 Atmes1-1、Atmes1-2 突变体株系的角果解剖图(标尺为 0.5 mm)。d: Col 和 Atmes1-1、Atmes1-2 突变体株系的种子密度统计。“*”表示 $P < 0.05$ 。下同。

a: Siliques of Col, Atmes1-1, and Atmes1-2 mutants (Bar = 1 mm). b: Seed number per silique of Col, Atmes1-1, and Atmes1-2 mutants. c: Dissected siliques of Col, Atmes1-1, and Atmes1-2 mutants (Bar = 0.5 mm). d: Seed density of Col, Atmes1-1, and Atmes1-2 mutants. “*” indicates $P < 0.05$. Same below.

图 3 Col 和 AtMES1 突变体株系表型分析
Fig. 3 Phenotype analysis of Col and AtMES1 mutant lines

珠发育、配子发育、雌雄互作以及合子发育都没有异常, AtMES1 角粒数降低源自胚珠决定和起始过程受影响导致的胚珠数目减少(图 3: c)。已有研究^[4, 19]和我们的观察结果都表明胚珠起始和发育主要集中在花发育时期第 9~12 期, 胚珠原基起始主要在 9 期。因此, 为进一步探究突变体胚珠数量减少的原因, 本研究对 AtMES1 突变体株系和野生型花发育 9 期的幼嫩花蕾进行了全基因组转录水平的分析。通过比较野生型与 AtMES1 突变体基因表达水平, 鉴定出了 2927 个差异表达基因($P < 0.05$), 其中 1503 个在 AtMES1 突变体株系中表达上调, 1424 个表达下调。将差异表达基因通过 KEGG 信号通路富集分析, 发现上调基因主要集中于代谢途径(Metabolic pathways)和次生代谢物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)等通路中(图 4: a); 下调基因主要集中于植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)和剪接体(Spliceosome)等通路中(图 4: b)。在突变体株系中下调表达的基因显著富集于植物激素信号转导通路, 表明 AtMES1 可能

参与了植物激素调控胚珠起始和角粒数调控的过程。我们发现在 AtMES1 突变体株系中有 4 个影响雌蕊、胚珠起始和胚珠发育的基因表达都显著下调(表 2), 而这几个基因都是通过植物激素信号, 如生长素、细胞分裂素和油菜素甾醇调控胚珠数目及角粒数。因此 AtMES1 功能下降造成的激素信号改变可能是突变体胚珠数目和角粒数减少的原因。

2.5 AtMES1-OXs 过表达株系的研究

为了进一步证明 AtMES1 对角粒数和种子密度的影响, 我们使用胎座特异高表达的 STK 的启动子驱动 AtMES1 基因, 使其在胎座上的过表达, 构建了过表达株系 AtMES1-OXs。

2.5.1 AtMES1-OXs 过表达株系的表达量分析

将筛选出来的转基因阳性苗进行基因型鉴定之后进行表达量分析, 结果显示, 与野生型相比, AtMES1 基因的过表达株系 AtMES1-OX-1、AtMES1-OX-2 和 AtMES1-OX-3 中, AtMES1 的表达量显著性增加, 其中 AtMES1-OX-1、AtMES1-OX-2 是野生型的十几倍(图 5), 表明在这些植株

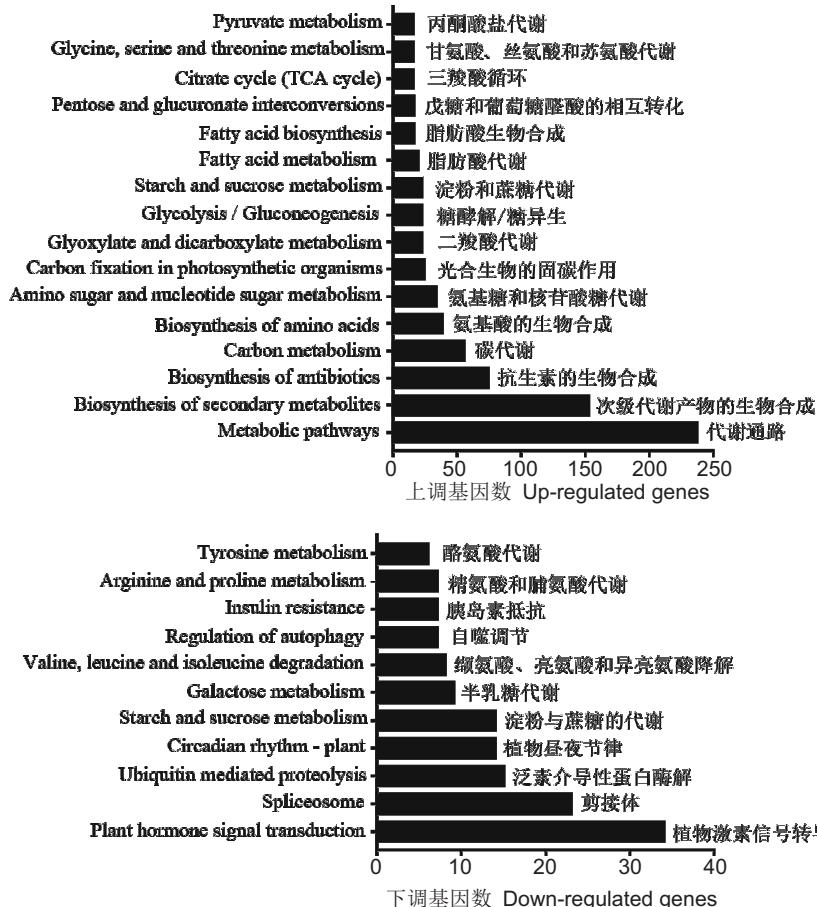
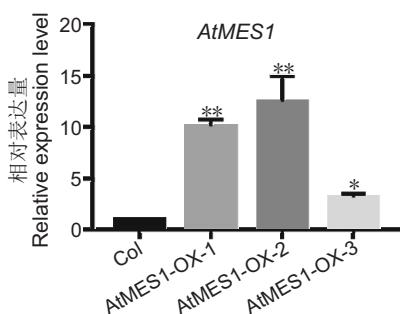


图 4 KEGG 聚类分析
Fig. 4 KEGG cluster analysis

表 2 *AtMES1* 突变体中下调的胚珠起始和发育相关基因

Table 2 Down-regulated genes related to ovule initiation and development in *AtMES1* mutant lines

基因 Gene ID	基因名称 Gene name	功能 Function	<i>AtMES1</i> vs Col	
			Log2FC	P-value
AT4G36930	SPL	可激活生长素合成基因和增强细胞分裂素从而调节心皮发育 ^[30-32]	-0.92687031	0.021993656
AT3G15170	CUC1	调节细胞分裂素,从而影响胚珠起始和胚珠数目 ^[33]	-0.88990778	0.0004541776
AT5G53950	CUC2	调节细胞分裂素,从而影响胚珠起始和胚珠数目 ^[33]	-0.62758796	0.0001738212
AT2G38050	DET2	BR 缺乏突变体 <i>det2</i> 的胚珠数目和角粒数减少 ^[24]	-0.55011052	0.016352592



AtMES1-OXs 过表达株系中 *AtMES1* 的表达量与 Col 比对结果。
Gene expression level of *AtMES1* in AtMES1-OXs compared with that of Col.

图 5 AtMES1-OXs 过表达株系的基因表达量

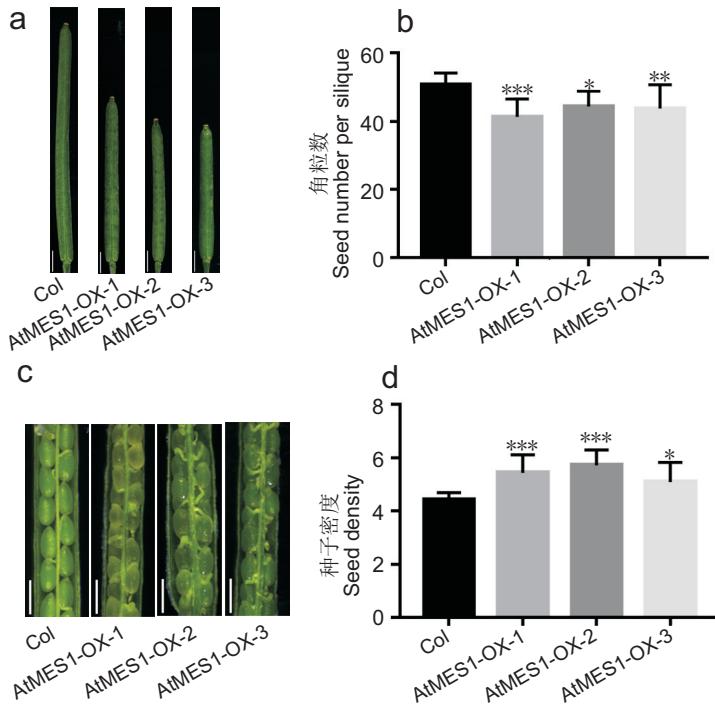
Fig. 5 qRT-PCR of *AtMES1* gene in AtMES1-OXs

© Plant Science Journal

中有效过量表达了 *AtMES1*。

2.5.2 AtMES1-OXs 过表达株系的表型分析

本研究比较了 AtMES1-OX-1、AtMES1-OX-2、AtMES1-OX-3 过表达株系的角果长度、角粒数和种子密度，发现过表达株系的角果长度短于野生型(图 6: a)。与野生型相比，过表达株系的角粒数减少(图 6: b)，但是种子排列密集(图 6: c)，单位角果长度上的种子数量(即种子密度)比野生型显著增加(图 6: d)。表明 STK 驱动 *AtMES1* 在胎座中过表达可能促进了胚珠起始过程，使单位长度的胎座上的胚珠起始明显增加，进而提高了种子密度。



a: Col 和过表达株系 AtMES1-OXs 的角果(标尺为 1 mm)。b: Col 和过表达株系 AtMES1-OXs 的角粒数。c: Col 和过表达株系 AtMES1-OXs 的角果解剖图(标尺为 0.5 mm)。d: Col 和过表达株系 AtMES1-OXs 的种子密度统计。“***”表示 $P < 0.001$ 。

a: Siliques of Col and AtMES1-OXs (overexpression lines) (Bar = 1 mm). b: Seed number per siliques of Col and AtMES1-OXs. c: Dissected siliques of Col and AtMES1-OXs (Bar = 0.5 mm). d: Seed density of Col and AtMES1-OXs. “***” indicates $P < 0.001$.

图 6 Col 和过表达株系 AtMES1-OXs 表型分析
Fig. 6 Phenotype analysis of Col and AtMES1-OXs

3 讨论

由于空间和营养的限制，在很多农作物中千粒重与籽粒数呈负相关^[34, 35]，因此有些时候提高种子数量反而对产量不利。但是目前的研究显示种子数量和重量并非绝对负相关^[10, 24, 36]，因此在种子重量不显著降低的情况下，增加种子数量是提高种子产量的一种新方法。

拟南芥角粒数的最大可能性是由胚珠数目原基决定的，因此胚珠决定和起始过程对最终的角粒数至关重要。在不影响育性的情况下，只要增加胚珠起始，就能提高角粒数。调控胚珠发育、配子发育、受精过程以及合子发育的基因和信号通路只能保证角粒数在胚珠原基数的基础上不损失，但不能增加角粒数。胚珠决定和起始过程受很多因素的影响，如参与胚珠决定的重要转录因子和调控蛋白^[14]，主要涉及编码 MADS 转录因子家族和其它调节因子，如 AGAMOUS (AG)、AINTEGUMENTA (ANT)、BELL1 (BEL1)、APETALA2 (AP2)、

SHATTERPROOF1 (SHP1) 和 HUELLENLOS (HLL) 等^[37-41]。还有植物激素，如生长素、细胞分裂素、油菜素甾醇、赤霉素等^[4, 10, 24, 42, 43]。

本研究中 AtMES1 是一种羧酸酯酶，在体外与多种植物激素的羧酸酯密切相关^[29]。根据 AtMES1 突变体株系的转录组数据分析消费结果发现，突变体株系中表达下调的基因显著富集于植物激素信号转导通路中。并且下调的基因中包括 SPL、CUC1/2、DET2，这些基因通过植物激素，如生长素、细胞分裂素、油菜素甾醇直接或间接的调控胚珠起始和发育，最终影响胚珠数目和角粒数。AtMES1-OXs 在胎座上的过表达导致角果长度变短，但单位长度角果上的种子数量反而上升，因此种子密度增加。角果长度下降的机制暂未明晰，尚待详细探究；单位长度上的角果数量增加意味着单位长度胎座上的胚珠起始数量增加，推测 AtMES1 在胎座上的过量表达激活了生长素等植物激素信号，促进了胚珠的侧生起始。植物激素影响胚珠数目，胚珠起始及角粒数是多方面的，其中不乏

激素之间相互促进或拮抗等复杂的关系, 具体的调控机制还有待进一步研究。综上所述, 本研究初步证实了 AtMES1 正调控拟南芥胚珠决定与起始过程, 进而影响了角粒数和种子密度。

参考文献:

- [1] Tong H, Chu C. Functional specificities of brassinosteroid and potential utilization for crop improvement [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23 (11): 1016–1028.
- [2] Jiang WB, Lin WH. Brassinosteroid functions in *Arabidopsis* seed development [J]. *Plant Signal Behav*, 2013, 8 (10): e25928.
- [3] Irish V. The ABC model of floral development [J]. *Curr Biol*, 2017, 27 (17): R887–R890.
- [4] Yu SX, Zhou LW, Hu LQ, Jiang YT, Zhang YJ, et al. Asynchrony of ovule primordia initiation in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2020, 147 (24): 196618.
- [5] Gómez MD, Fuster-Almunia C, Ocaña-Cuesta J, Alonso JM, Pérez-Amador MA. RGL2 controls flower development, ovule number and fertility in *Arabidopsis* [J]. *Plant Sci*, 2019, 281: 82–92.
- [6] Pereira PA, Boavida LC, Santos MR, Becker JD. AtNOT1 is required for gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2020, 103(4): 1289–1303.
- [7] Hackenberg D, Twell D. The evolution and patterning of male gametophyte development [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2019, 131: 257–298.
- [8] Yuan J, Kessler SA. A genome-wide association study reveals a novel regulator of ovule number and fertility in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Genet*, 2019, 15 (2): e1007934.
- [9] Di Marzo M, Roig-Villanova I, Zanchetti E, Caselli F, Greghis V, et al. MADS-Box and bHLH transcription factors coordinate transmitting tract development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 526.
- [10] Bartrina I, Otto E, Strnad M, Werner T, Schmülling T. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(1): 69–80.
- [11] Bencivenga S, Simonini S, Benková E, Colombo L. The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(7): 2886–2897.
- [12] Marsch-Martínez N, de Folter S. Hormonal control of the development of the gynoecium [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, 29: 104–114.
- [13] Marhavý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, et al. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(4): 796–804.
- [14] Cucinotta M, Di Marzo M, Guazzotti A, de Folter S, Kater MM, et al. Gynoecium size and ovule number are interconnected traits that impact seed yield [J]. *J Exp Bot*, 2020, 71(9): 2479–2489.
- [15] Sita K, Sehgal A, Kumar J, Kumar S, Singh S, et al. Identification of high-temperature tolerant Lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes through leaf and pollen traits [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 744.
- [16] Jiang Y, Lahiali R, Karunakaran C, Warkentin TD, Davis AR, et al. Pollen, ovules, and pollination in pea: success, failure, and resilience in heat [J]. *Plant Cell Environ*, 2019, 42(1): 354–372.
- [17] Plackett ARG, Powers SJ, Phillips AL, Wilson ZA, Heden P, et al. The early inflorescence of *Arabidopsis thaliana* demonstrates positional effects in floral organ growth and meristem patterning [J]. *Plant Reprod*, 2018, 31(2): 171–191.
- [18] Wang Y, Li Y, Yan X, Ding L, Shen L, et al. Characterization of C- and D-Class MADS-box genes in Orchids [J]. *Plant Physiol*, 2020, 184(3): 1469–1481.
- [19] Robinson-Beers K, Pruitt RE, Gasser CS. Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(10): 1237–1249.
- [20] Cucinotta M, Colombo L, Roig-Villanova I. Ovule development, a new model for lateral organ formation [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 117.
- [21] Ó'Maoiléidigh DS, Gracié E, Wellmer F. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development [J]. *New Phytol*, 2014, 201(1): 16–30.
- [22] Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, et al. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2603–2611.
- [23] Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, et al. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development [J]. *Nature*, 2003, 424(6944): 85–88.
- [24] Huang HY, Jiang WB, Hu YW, Wu P, Zhu JY, et al. BR signal influences *Arabidopsis* ovule and seed number through regulating related genes expression by BZR1 [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(2): 456–469.
- [25] Gonçalves B, Hasson A, Belcram K, Cortizo M, Morin H, et al. A conserved role for CUP-SHAPED COTYLEDON genes during ovule development [J]. *Plant J*, 2015, 83 (4): 732–742.
- [26] Ceccato L, Masiero S, Sinha Roy D, Bencivenga S, Roig-Villanova I, et al. Maternal control of PIN1 is required for female gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66148.

- [27] Galbiati F, Sinha Roy D, Simonini S, Cucinotta M, Ceccato L, et al. An integrative model of the control of ovule primordia formation [J]. *Plant J*, 2013, 76(3): 446–455.
- [28] Jiang HL, Hong J, Jiang YT, Yu SX, Zhang YJ, et al. Genome-wide association analysis identifies candidate genes regulating seed number per siliques in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(5): 585.
- [29] Yang Y, Xu R, Ma CJ, Vlot AC, Klessig DF, et al. Inactive methyl indole-3-acetic acid ester can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the At-MES esterase family of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(3): 1034–1045.
- [30] Alvarez J, Smyth DR. CRABS CLAW and SPATULA, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS [J]. *Development*, 1999, 126(11): 2377–2386.
- [31] Heisler MG, Atkinson A, Bylstra YH, Walsh R, Smyth DR. SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein [J]. *Development*, 2001, 128(7): 1089–1098.
- [32] Reyes-Olalde JI, Zúñiga-Mayo VM, Serwatowska J, Chavez Montes RA, Lozano-Sotomayor P, et al. The bHLH transcription factor SPATULA enables cytokinin signaling, and both activate auxin biosynthesis and transport genes at the medial domain of the gynoecium [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(4): e1006726.
- [33] Cucinotta M, Manrique S, Cuesta C, Benkova E, Novak O, et al. CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) and CUC2 regulate cytokinin homeostasis to determine ovule number in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(21): 5169–5176.
- [34] Zhai H, Feng Z, Du X, Song Y, Liu X, et al. A novel allele of *TaGW2-A1* is located in a finely mapped QTL that increases grain weight but decreases grain number in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2018, 131(3): 539–553.
- [35] Guan P, Di N, Mu Q, Shen X, Wang Y, et al. Use of near-isogenic lines to precisely map and validate a major QTL for grain weight on chromosome 4AL in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2019, 132(8): 2367–2379.
- [36] Zhang YC, Yu Y, Wang CY, Li ZY, Liu Q, et al. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 848–852.
- [37] Modrusan Z, Reiser L, Feldmann KA, Fischer RL, Haughn GW. Homeotic transformation of ovules into carpel-like structures in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(3): 333–349.
- [38] Arnaud N, Pautot V. Ring the BELL and tie the KNOX: roles for TALEs in gynoecium development [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 93.
- [39] Zumajo-Cardona C, Pabón-Mora N, Ambrose BA. The evolution of euAPETALA2 genes in vascular plants: from plesiomorphic roles in sporangia to acquired functions in ovules and fruits [J]. *Mol Biol Evol*, 2021, 38(6): 2319–2336.
- [40] Schneitz K, Baker SC, Gasser CS, Redweik A. Pattern formation and growth during floral organogenesis: HUELLENLOS and AINTEGUMENTA are required for the formation of the proximal region of the ovule primordium in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 1998, 125(14): 2555–2563.
- [41] Brambilla V, Battaglia R, Colombo M, Masiero S, Benavenga S, et al. Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(8): 2544–2556.
- [42] Barro-Trastoy D, Carrera E, Baños J, Palau-Rodríguez J, Ruiz-Rivero O, et al. Regulation of ovule initiation by gibberellins and brassinosteroids in tomato and *Arabidopsis*: two plant species, two molecular mechanisms [J]. *Plant J*, 2020, 102(5): 1026–1041.
- [43] Gomez MD, Barro-Trastoy D, Escoms E, Saura-Sánchez M, Sánchez I, et al. Gibberellins negatively modulate ovule number in plants [J]. *Development*, 2018, 145(13): 163865.

(责任编辑:周媛)