

水稻雌性败育基因 *FA* 的图位克隆

吕凤¹ 唐倩莹¹ 王启明¹ 郑海¹ 尤世民¹ 柏文婷¹ 肖晏嘉¹ 赵志刚^{1,*} 万建民^{1,2}

(¹ 南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; ² 中国农业科学院 作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081; *通讯联系人, E-mail: zhaozg@njau.edu.cn)

Map-based Cloning of *Female Abortion (FA)* Gene in Rice

LÜ Feng¹, TANG Qianying¹, WANG Qiming¹, ZHENG Hai¹, YOU Shimin¹, BAI Wenting¹, XIAO Yanjia¹, ZHAO Zhigang^{1,*}, WAN Jianmin^{1,2}

(¹ State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; *Corresponding author, E-mail: zhaozg@njau.edu.cn)

Abstract: 【Objective】Phenotypic observation, genetic mapping and gene cloning of rice embryo sac mutants will lay a theoretical basis for recovering plant reproductive development. 【Method】A *female abortion (fa)* mutant was obtained from ethyl methylsulfonate (EMS)-treated Ningjing 4. The embryo sacs of the wild-type and mutant were observed at different developmental stages, and the types of mutant embryo sacs were also calculated. The heterozygous mutant was used as the female parent and N22 as the male parent to construct the mapping population. The phenotype was analyzed by genetic analysis, and the target gene was precisely mapped by map-based cloning method. 【Result】Phenotypic analysis showed that the mutant's pistil showed no difference in appearance, but the plants showed complete sterility at maturity. Compared with the wild type, the development of the mutant embryo sacs was abnormal, which could not form seven-cell eight-nuclear structure. Genetic analysis showed that the *fa* mutant traits were controlled by a single recessive gene. The gene was initially mapped between the L1 and L3 markers on chromosome 1 and finally between markers L10 and L11 by expanding the mapping population, with a physical distance of 117 kb. Sequencing analysis showed that LOC_Os01g68870 had a single base substitution in exon, from thymine(T) to cytosine(C), leading to amino acid change from leucine to proline and this phenotype. The results of qRT-PCR showed that compared with *OsMADS13*, *OsAPC6* and *OsTDL1A*, the expression level of *OsDEES1* in the mutant *fa* embryo sacs was the most significant, and *FA* might act at *OsDEES1* upstream. Subcellular localization showed that the *FA* protein is localized to the plasma membrane. 【Conclusion】According to the present study, *FA* gene was a new allele of *MSPI*. Our work further elucidates the importance of this gene in the development of embryo sacs and provides new clues in regulation the network system.

Key words: female abortion mutant; genetic analysis; map-based cloning; rice

摘 要: 【目的】对水稻胚囊突变体的表型观察、遗传定位和基因克隆, 将为研究植物生殖发育奠定理论基础。

【方法】从粳稻品种宁粳4号突变体库中筛选出一个雌性败育突变体 *female abortion(fa)*, 对野生型和突变体不同发育时期的胚囊进行细胞学观察并统计胚囊类型。以突变体杂合型为母本, N22 为父本构建定位群体, 对该表型进行遗传分析, 采用图位克隆方法精确定位目的基因。【结果】表型分析显示, 突变体雌蕊在外观上没有表现出差异, 但成熟时植株完全不育。与野生型相比, 该突变体胚囊发育异常, 不能形成七细胞八核胚囊结构, 而且形成多种类型的异常胚囊。遗传分析表明, 该突变性状受一对隐性核基因控制。我们将该基因初定位在第1染色体的分子标记 L1 和 L3 之间, 通过扩大定位群体, 最终将基因定位在分子标记 L10 和 L11 之间, 物理距离为 117 kb。测序分析发现该区间内 LOC_Os01g68870 外显子上有一个单碱基替换, 由胸腺嘧啶(T)替换成胞嘧啶(C), 氨基酸由亮氨酸变为脯氨酸, 从而导致该表型的出现。qRT-PCR 结果显示, 相对于 *OsMADS13*、*OsAPC6*、*OsTDL1A* 基因在突变体 *fa* 胚囊中表达量而言, *OsDEES1* 基因在突变体 *fa* 胚囊中表达量变化最为显著, *FA* 可能是 *OsDEES1*

收稿日期: 2018-03-09; 修改稿收到日期: 2018-04-03。

基金项目: 国家自然科学基金委与云南省人民政府共同设立联合基金资助项目(U1502265)。

的上游基因。亚细胞定位结果显示,该蛋白定位于质膜。【结论】*FA*是多孢囊基因 *MULTIPLE SPOROCTE 1(MSP1)*的新等位基因。本研究进一步明确了该基因对于水稻胚囊发育的重要性,可为阐明它所在的调控网络体系提供新的线索。

关键词:雌性败育突变体;遗传分析;图位克隆;水稻

文献标识码:Q343.5; Q785; S511.0351

中图分类号:A

文章编号:1001-7216(2018)06-0519-10

植物雌性不育是自然界普遍存在的现象,在拟南芥、玉米和水稻等植物上已有相关报道^[1-3]。植物的雌性不育通常指雌性器官发育异常,而正常植物的雌性器官发育主要指子房的发育,包括胚珠发育和胚囊形成。水稻雌蕊由柱头、花柱和子房三部分构成,两个柱头与花柱处融合,在雌蕊基部膨大部分是子房。子房内部着生胚珠,胚珠内部将形成胚囊。水稻成熟胚囊具有七细胞八核的结构,包括一个卵细胞、两个助细胞、两个中央细胞核(极核)和三个反足细胞^[4]。凌定厚等^[5]将雌性不育类型分为三类,第一类是雌性器官不分化或者雌蕊雄蕊化,不存在雌蕊,形成雄性水稻;第二类是雌蕊发育缺陷,具有雌性器官但胚囊发育异常;第三类是具有正常胚囊但卵细胞退化。

双子叶植物花器官发育的分子机制可用ABCDE模型解释^[6],该模型同样适用于单子叶植物。花器官异常发育会导致雌性不育。*OsMADS13*属于水稻胚珠发育D基因,*osmads13*突变体胚珠发育出现异常导致雌性不育^[7]。在双突变体*osmads13-3 osmads3-4*中表现出花分生组织丧失,胚珠产生了过量的类胡萝卜素,认为*OsMADS3*与*OsMADS13*在胚珠发育和花分生组织发育过程中起到协同作用。双突变体*osmads3-4 dl-sup6*花分生组织严重受损,表明*OsMADS3*和*DROOPING LEAF(DL)*协同终止花分生组织^[8]。*DL*并不属于MADS-box基因,而属于C类基因。*DL*是一个转录因子基因,编码一个锌指结构域和一个YABBY结构域,在雌蕊的发育过程中起重要作用,其功能丧失会导致雌蕊完全雄蕊化^[9]。在雌配子发育方面,Nonomura等^[10]通过逆转座子Tos17插入技术鉴定了一个多孢囊基因 *MULTIPLE SPOROCTE 1(MSP1)*,该基因起到控制水稻大、小孢子母细胞数目的作用,同时影响花粉囊壁的发育。该基因的缺失或变异将导致水稻花器官组织的发育异常,表现出完全的雄性不育,但授野生型花粉时突变体能够产生可育的种子。*OsTDL1A/MIL2*调控心皮、雌蕊的发育,同时影响了雌雄配子的育性^[11-12]。*OsTDL1A-MSP1*信号通路在维持体细胞特性和抑制水稻胚囊细胞过度增殖中起到核心作用^[13]。

目前通过突变体克隆的只影响雌配子形成而不影响雄配子形成的基因主要是 *OsAPC6*^[14-15]和 *OsDEES1*^[3]。*OsAPC6*编码一个APC蛋白,其功能缺失可能导致有丝分裂中期向后期过渡的相关酶失活,从而使发生分裂的细胞减少^[15]。突变体*osapc6*主要表现为雄性配子育性正常而雌性配子部分不育,结实率降低;胚珠发育正常,减数分裂正常^[14],但部分花(约30%)中功能大孢子第一次有丝分裂正常,第二次有丝分裂开始出现异常。研究表明,*OsAPC6*基因虽然影响雌配子发育和赤霉素应答,但不影响雄配子发育^[15]。Wang等^[3]将细胞壁相关类受体激酶(wall-associated receptor-like kinase, WAR-RLK)基因 *OsDEES1*敲除后得到的转基因植株表现为雌配子不育。细胞学观察表明*OsDEES1*基因的敲除虽然不影响大孢子发生,但是干扰雌配子体形成,导致形成退化的胚囊和有缺陷的种子。

本研究对水稻 *female abortion(fa)*突变体进行细胞学观察和基因图位克隆,并对胚囊发育相关基因进行定量表达分析,旨在研究 *FA*基因在胚囊发育中的作用,为研究植物生殖发育奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

*fa*突变体通过化学诱变剂甲基磺酸乙酯处理粳稻品种宁粳4号获得。2014年在南京江宁区土桥水稻基地(东经118°48',北纬31°52')以杂合型可育植株为母本与N22配杂交组合得到F₁;同年,将F₁种子种植于南京农业大学南繁基地(海南陵水,东经110°02',北纬18°48')得到F₂。2015年将F₂种植于南京江宁区土桥水稻基地得到F₂群体用于定位。同时将*fa*杂合型植株自交得到F₂群体,调查F₂群体的育性分离比。

1.2 曙红染色法观察胚囊的发育过程

从孕穗到抽穗时分别取野生型和突变体小穗,置于卡诺固定液(无水乙醇:冰醋酸体积比为3:1)中,抽真空保存于4℃条件下直至使用。根据小穗着生的位置和长度,将野生型和突变体的小花置于

解剖镜下，然后用解剖针将雌蕊分离出来。从 1.5 mm 长的小穗开始，按照 0.5 mm 为一个组，一共分为 15 个组。样品经 70%、50% 和 30% 酒精溶液、蒸馏水和 2% 硫酸铝钾溶液连续处理，每级 20 min；10 mg/L 曙红浸染 10~12 h；2% 的硫酸铝钾溶液处理 20 min；蒸馏水漂洗 3 次；30%、50%、70%、80% 和 90% 酒精溶液处理，每级 20 min，无水乙醇再处理 4 次；无水乙醇和水杨酸甲酯体积比为 1:1 的溶液处理 1~2 h，纯水杨酸甲酯透明 12 h 以上，直至子房呈现透明。

处理后的样品放入已滴有水杨酸甲酯的凹面载玻片上，盖上盖玻片，倒放于 Zeiss 激光共聚焦显微镜下进行观察并拍照。总共观察野生型雌蕊 156 个和突变体雌蕊 216 个

1.3 基因定位

采用 CTAB^[16]法提取各单株叶片总 DNA 用于基因定位。以杂合型(*FA/fa*)植株和印度籼稻品种 N22 杂交获得 F₁ 种子，种植 F₁ 群体获得具有纯合和杂合两种基因型种子，再将这两种基因型按家系播种获得次级 F₂ 群体，在 F₂ 群体中挑选具有 *fa* 表型的单株，采用极端隐性个体定位的方法进行基因定位。利用实验室已有的 SSR 标记与 InDel 标记共 170 个，对 F₂ 群体中的 10 个隐性极端个体进行初步连锁分析。然后再扩大极端个体数量进行精细定位。PCR 总体积 10 μL，含 1.0 μL 10×PCR 缓冲液，

0.1 μL 10 mmol/L dNTPs，正反向引物各 1.0 μL，1 μL DNA，0.1 μL *Taq* DNA 聚合酶，5.8 μL ddH₂O。PCR 程序如下：94℃ 下预变性 4 min；94℃ 下变性 30 s、58℃ 下退火 30 s、72℃ 下延伸 30 s，35 个循环；72℃ 下延伸 10 min。将 PCR 产物在聚丙烯凝胶上电泳分离。定位引物见表 1。

1.4 实时荧光定量 PCR

分别取野生型和突变体的幼穗、根、茎秆、幼叶、叶鞘迅速置于 -80℃ 保存直至使用。早上 10 点左右采集孕穗到抽穗前的幼嫩稻穗，对穗长进行测量。将小穗长从 1.5 mm 开始，划分成 S1(1.5~2.0 mm)、S2(2.1~2.5 mm)、S3a(2.6~3.0 mm)、S3b(3.1~3.5 mm)、S4(3.6~4.0 mm) 五组。将野生型和突变体的小穗置于解剖镜下，用解剖针将胚囊分离出来，置于 -80℃ 下保存直至使用。使用植物总 RNA 提取试剂盒(康为世纪)提取总 RNA。取 2 μg RNA 作为模板，经 SuperScript II 试剂盒(TaKaRa 公司)反转录为 cDNA。利用实时荧光定量 PCR 分析基因的表达水平。扩增程序如下：95℃ 下 30 s，95℃ 下 5 s，40 个循环，60℃ 下 30 s，95℃ 下 15 s，60℃ 下 1 min，95℃ 下 15 s。*OsUbiquitin* 基因作为内参照基因，计算出目的基因的相对表达量。定量表达引物见表 1。

1.5 转基因烟草细胞中的亚细胞定位

构建 FA: PAN580-GFP 载体，然后转入到农杆菌中用于烟草表皮细胞转染。转染方法如下：1)接

表 1 本研究定位和定量 PCR 所用引物序列
Table 1. Primer for gene mapping and qRT-PCR.

引物名称 Primer name	正向引物 Forward sequence(5'-3')	反向引物序列 Reverse sequence(5'-3')	实验目的 Purpose
L1	ACGCTGAAAAGCAAGGATGT	TTCTAGCCCTCTCTTTGACA	初定位 Preliminary mapping
L2	AATTCGGTCACTCGCTGTACAG	CTGCGGACGAAATTGCTTAGCC	初定位 Preliminary mapping
L3	GGGATTATTGAAATCTTTGC	ATATAGCATTGCCAGTTTGC	初定位 Preliminary mapping
L4	GTCGACGGCTTCTCAAGATTGG	TGAGACCTCTGTGAAGGCACTCG	初定位 Preliminary mapping
L5	CGAGTTCGTCCAAGTGAGC	CATCCACCATTCACCAATC	精细定位 Fine mapping
L6	GAAAGGTGATGGGAGAGCAG	TGACACCCTCTCTCCACCTC	精细定位 Fine mapping
L7	AAGCCAGCAATGTTATGAGC	CATTACCAGCAGCGGAGTA	精细定位 Fine mapping
L8	CATGGGCCAGAATTAAGAGG	CATCCACTTTCTCTCTCTGC	精细定位 Fine mapping
L9	GCATGCTACCACCTTGACTGC	GTGAGTAGCGAGACCGAGAGTGC	精细定位 Fine mapping
L10	AGCTGTGCGAGGAATCCAAACG	CTCCGATCCCAGCAGCTACTCC	精细定位 Fine mapping
L11	GTTATATGGCTCTGGCACGC	TTGTTTAGGACACCGCTTGC	精细定位 Fine mapping
L12	TGTTGTGAAGTGATTGGCA	CAAGACACATCGTACCGCTG	精细定位 Fine mapping
L13	TTGCTCCTCCCTACAACAGT	AGCTATGGCAAGAAGAGGTGA	精细定位 Fine mapping
L14	TGGTTACCTGCCTTGATCGA	CTTTCTGCTCCGTTTGTTC	精细定位 Fine mapping
FA	TGTGGCTGAGAAACCGAGCA	CGACTTCATGTCCCGGTGGA	qRT-PCR
<i>OsTDL1A</i>	ACGACGACTGCCTCTCTCAAC	GAGGCGTAGCAAATGGTGAG	qRT-PCR
<i>OsMSH4</i>	TGCCAGGAATAAGTCTGCTG	TAATACTTCGGCAAGCAACG	qRT-PCR
<i>OsDEES1</i>	CCCGGTAAGTGAGGTTACAA	TGATCCAAAACCACTCCAGA	qRT-PCR

种载有 FA: PAN580-GFP 质粒的农杆菌到含有利福平和卡那霉素抗性的 YEP 培养基中, 28℃、200 r/min 下培养, 利用紫外分光光度计测菌液的 OD 值达到 0.8~1.0 时, 取菌液离心收集菌沉淀; 2) 当菌液 OD_{600} 值达到 0.6~1.0 时, $1000\times g$ 下离心 5 min 后收集菌液; 3) 诱导培养基(无乙酰丁香酮)轻柔重悬农杆菌, 然后再次离心收集菌液, 重复一次; 4) 所得沉淀用 1 mL 诱导培养基重悬, 室温放置 2~3 h, 测定 OD_{600} 值。将菌液用诱导培养基稀释至 $OD_{600}=0.1$; 5) 用去掉针尖的 5 mL 小型注射器注射 6~8 周大的本氏烟草, 取 1~2 mL 的菌液从叶片背面缓慢注射, 同时手指紧贴叶片正面, 使菌液缓慢渗入叶片中; 6) 48 h 后, 用小刀将叶片注射的位置切成 2 mm^2 大小, 置于已滴水的载玻片上, 盖上盖玻片于 Zeiss 激光共聚焦显微镜进行观察并拍照。

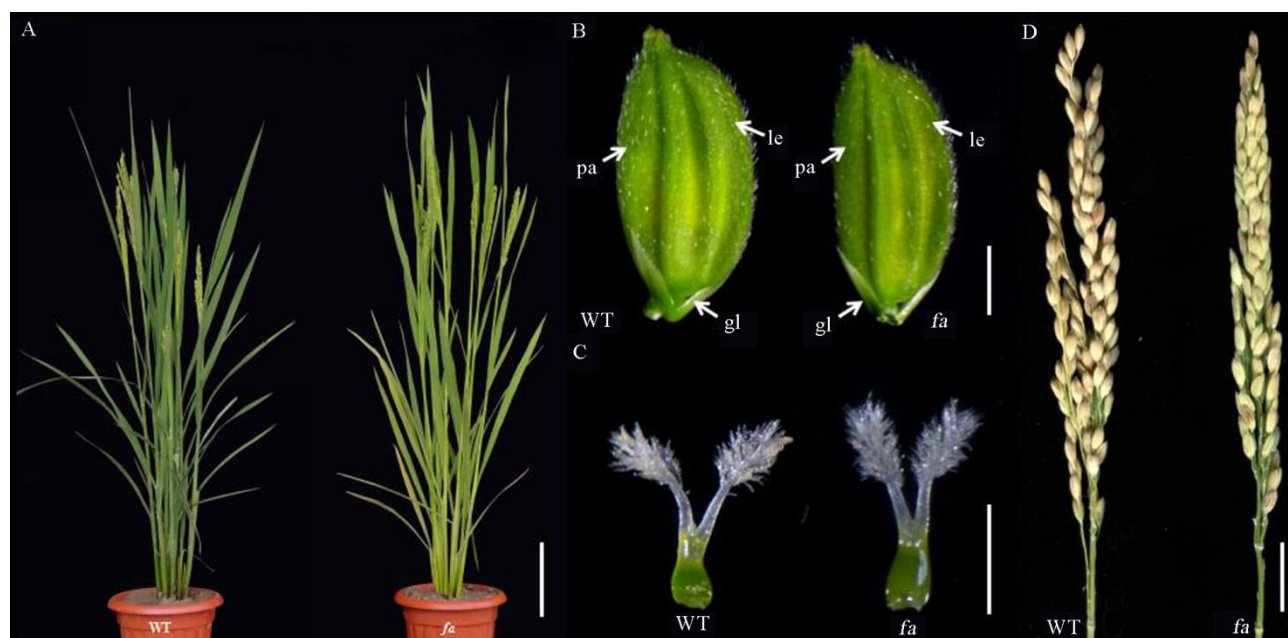
2 结果与分析

2.1 亲本和 *fa* 突变体的表型观察

与野生型相比, 突变体 *fa* 营养器官无明显差异(图 1-A~B), 去除颖花的内稃和外稃, 雌蕊在外观上无差异(图 1-C), 成熟后却表现出完全不育(图 1-D)。

2.2 *fa* 突变体胚囊发育异常

参照刘向东等^[17]的方法, 将正常水稻的胚囊形成和发育分成 8 个阶段。在孢子细胞形成阶段, 珠心中的一个表皮下细胞产生野生型的孢原细胞, 并在大孢子母细胞形成阶段发育成大孢子母细胞。大孢子母细胞进行减数分裂, 形成四分体大孢子(图 2-A~C)。其中, 最靠近珠孔的 3 个大孢子退化, 靠近合点处的一个大孢子继续发育形成功能大孢子(图 2-D)。功能大孢子继续发育为单核胚囊, 然后胚囊在有丝分裂阶段进行 3 次有丝分裂而产生两核、四核和八核胚囊(图 2-I~K)。随后在八核胚囊发育阶段发生细胞核的迁移和细胞化, 形成具有极核、反足细胞和助细胞的成熟胚囊(图 2-L)。与野生型相比, *fa* 突变体在孢原细胞形成期形成了多个孢原细胞(图 2-E)。*fa* 突变体中的大孢子母细胞在减数分裂前形成与野生型一致, 能形成大孢子母细胞, 但存在多个大孢子母细胞(图 2-F)。然而, 在大孢子母细胞减数分裂阶段, 与野生型中观察到的清晰四分体相比, 在 *fa* 突变体中仅观察到多个类似大孢子母细胞的细胞(图 2-G)。突变体具有类似大孢子母细胞的多核细胞, 表明形成大孢子母细胞后可能开始异常发育, 形成具有多个核的细胞(图 2-H)。随后, 只有降解的细胞印迹留在胚囊中直到成熟(图

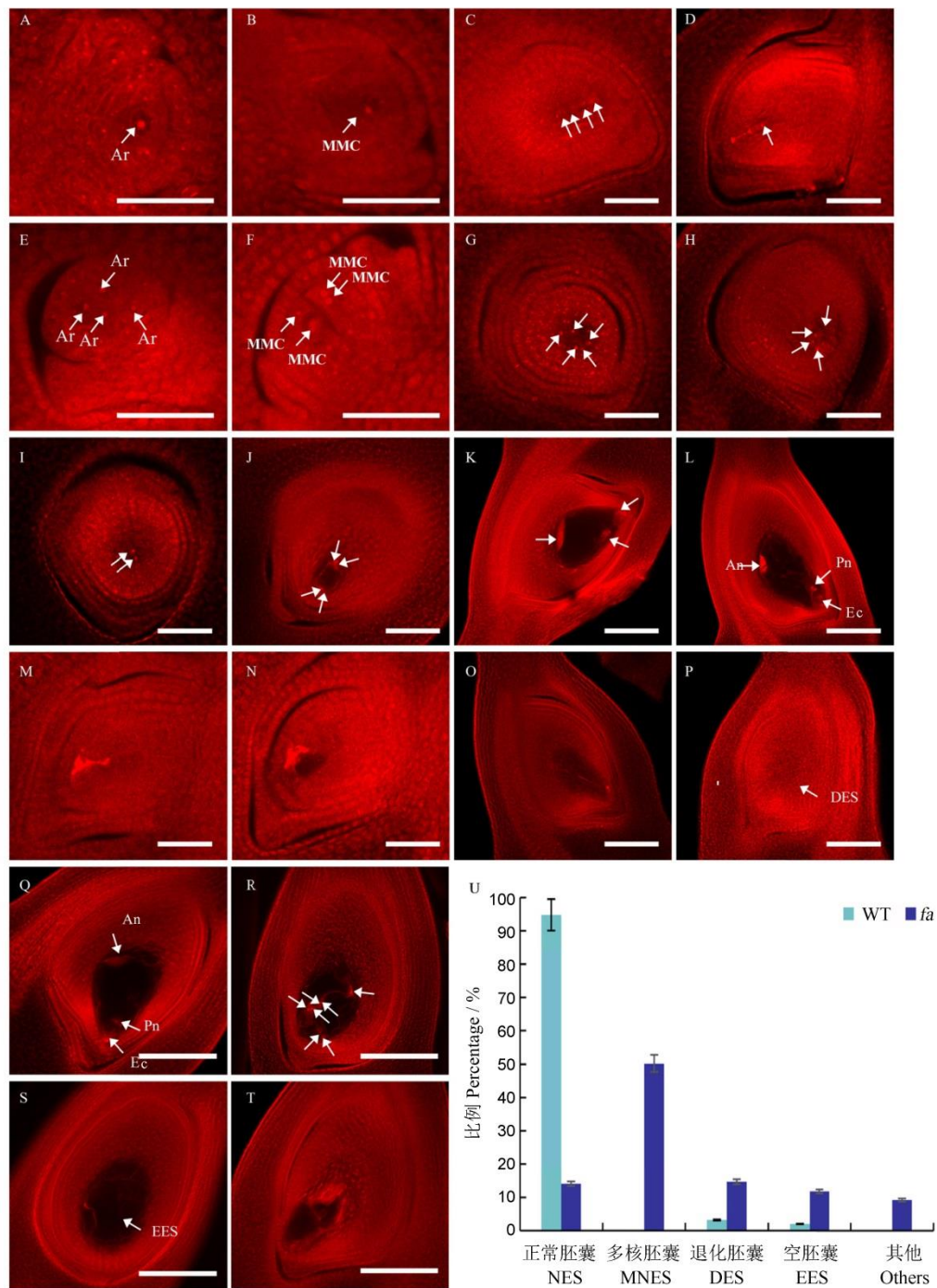


A—野生型和突变体 *fa* 的株型和抽穗形态, 标尺为 20 cm。B—野生型和突变体 *fa* 颖花表型, 标尺为 2 mm。le—外稃; pa—内稃; gl—护颖。C—野生型和突变体 *fa* 的雌蕊表型, 标尺为 1 mm。D—野生型和突变体 *fa* 的成熟穗, 标尺为 2.5 cm。

A, Plant morphology of the wild type(WT) and the *fa* mutant during heading, bar=20 cm. B, Spikelet of WT and the *fa* mutant, bar=2 mm. le, Lemma; pa, Palea; gl, Glume. C, Pistil of WT and the *fa* mutant, bar=1 mm. D, Mature spikelet of WT and the *fa* mutant, bar=2.5 cm.

图1 野生型和 *fa* 突变体表型

Fig. 1. Phenotypes of the wild type and the *fa* mutant.



A~D, I~L 为野生型胚囊发育过程; E~H, M~T 代表突变体 *fa* 胚囊发育过程。A 和 E—孢原细胞期; B 和 F—大孢子母细胞期; C 和 G—四分体期; D 和 H—功能大孢子期; I 和 M—二核胚囊期; J 和 N—四核胚囊期; K 和 O—八核胚囊期; L 和 P~T—成熟胚囊期。箭头指示核。U—统计野生型($n=156$)和突变体 *fa*($n=216$)成熟胚囊中不同类型的胚囊。An—反足细胞; Ar—孢原细胞; Ec—卵细胞; MMC—大孢子母细胞; Pn—极核。A~P 标尺为 50 μm , Q~T 标尺为 100 μm 。

A to D and I to L, Wild type; E to H and M to T, *fa* mutant. A and E, Archesprial cell stage; B and F, Megaspore mother cell stage; C and G, Tetrad stage; D and H, Functional megaspore stage; I and M, Bi-nuclear embryo sac; J and N, Tetra-nuclear embryo sac; K and O, Eight-nuclear embryo sac; L and P to T, Mature embryo sac. Arrows indicate nuclei. U, Statistics of different types of embryo sacs in mature embryo sac of the wild type ($n=156$) and the mutant ($n=216$). An, Antipode cell; Ar, Archesprial cell; Ec, Egg cell; MMC, Megaspores mother cell; Pn, Polar nuclei; NES, Normal embryo sac; MNES, Multi-nucleated embryo sac; DES, Degenerated embryo sac; EES, Empty sac with no embryo formation; Others, Other abnormal embryo sacs. Bar= 50 μm in A to P and 100 μm in Q to T.

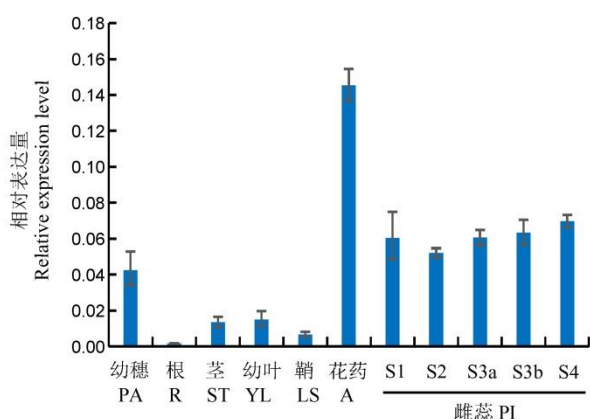
图 2 野生型和 *fa* 突变体的胚囊发育过程观察及其不同类型的胚囊统计

Fig. 2. Embryo sac development of the wild type(WT) and *fa* mutant and statistics of different types of embryo sacs.

间内的基因,发现有 18 个候选基因。基于该网站基因的注释并结合水稻表达谱数据库预测的基因表达模式,发现 LOC_Os01g68870 在花药和胚囊中表达量最高,其他基因在生殖阶段表达量不高。随后通过对野生型和突变体的 LOC_Os01g68870 测序发现突变体相对于野生型有一个单碱基替换,由胸腺嘧啶(T)替换成胞嘧啶(C)。该基因座位为已报道的 *MSP1* 基因,因此 *FA* 是它的一个等位基因。从图 3-B 可以看出,该新等位基因(*FA*)包含一个外显子,编码由 1294 个氨基酸组成的富亮氨酸重复类受体蛋白激酶 (Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, LRR-RLK),编码区第 1074 个氨基酸的密码子由编码亮氨酸的密码子 CTG 替换成编码脯氨酸的密码子 CCG,并且突变位点处于激酶结构域内。

2.4 *FA* 基因的组织表达模式

为了检测 *FA* 基因在水稻各组织中的表达模式,特别是胚囊发育早期的表达,我们进行了实时荧光定量 PCR 检测,结果如图 4 所示。基因 *FA* 在根、茎、幼叶、叶鞘、幼穗、花药、胚囊各组织中都有表达,说明该基因在水稻的营养生长和生殖生长两个阶段都起作用,但表达有明显差异。其中,在水稻花药和胚囊中表达量最高,在穗中表达量低于花药和胚囊,在茎和叶中表达量基本一致,在叶鞘中表达量较低,而在根中几乎不表达。以上结果可以说明, *FA* 基因属于组成型表达基因,而且在



以 *OsUbiquitin* 作为对照,误差线表示 $n=3$ 时的标准差。S1—孢原细胞形成期, S2—大孢子母细胞形成期, S3a—二分裂时期, S3b—四分体时期, S4—功能大孢子形成期。

PA, Panicle; R, Root; ST, Stem; YL, Young Leaf; LS, Leaf sheath; A, Anther; PI, Pistil. *OsUbiquitin* was used as an internal control, Error bars show *SD* ($n=3$). S1, Archisporial cell stage; S2, Megaspore mother cell stage; S3a, Dyad stage; S3b, Tetrad stage; S4, Functional megaspore stage.

图 4 *FA* 基因在水稻各组织中的相对表达量

Fig. 4. Relative expression levels of *FA* in rice tissues.

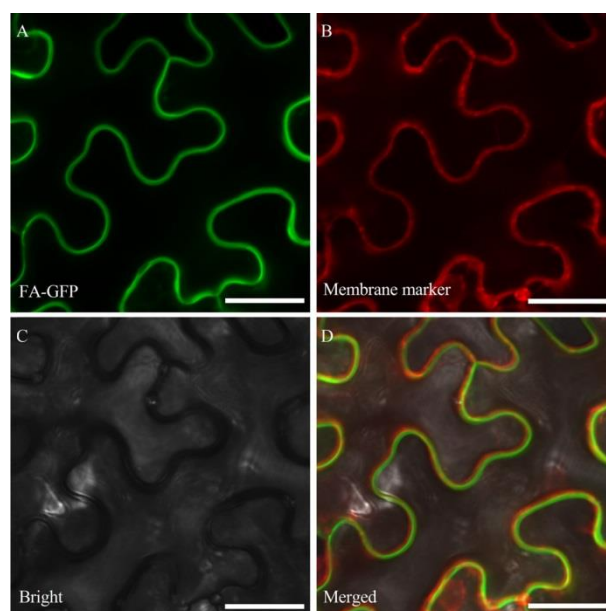
花药和胚囊中表达量较高,在胚囊 S1-S4 时期表达量无明显差异。因此,推测该基因在水稻的花药和胚囊中表达高于其他组织。

2.5 亚细胞定位

为了研究 *FA* 蛋白亚细胞定位,将融合表达载体 *FA-GFP* (GFP 是绿色荧光蛋白)质粒导入农杆菌感受态中,阳性转化子验证正确后,进行烟草注射。48 h 瞬时表达后,用刀片切下注射处叶片,在 Zeiss 激光共聚焦显微镜下观察。结果显示 *FA-GFP* 融合结构的绿色荧光主要出现在质膜,因此,将其定位于质膜(图 5)。

2.6 胚囊发育相关基因的表达分析

FA 基因在雌蕊中表达量较高且突变体在胚囊早期开始败育。因此,我们分别提取 S1-S4 时期雌蕊的 RNA,再将其反转录成 cDNA,而后通过 qRT-PCR 来检测 *fa* 突变体是否影响胚囊发育相关基因的表达情况。其中包括 MADS 盒基因 *OsMADS13*、调控雌配子发育和赤霉素应答基因 *OsAPC6*、绒毡层决定基因 *OsTDL1A*、细胞壁相关类受体蛋白激酶基因 *OsDEES1*。qRT-PCR 结果表明,在 S1 和 S2 时期 *OsMADS13* 基因表达量在突变体中显著上升,而在 S3a、S3b 和 S4 时期无差异;在 S1、S2、S3a 时期 *OsAPC6* 基因表达量在突变体

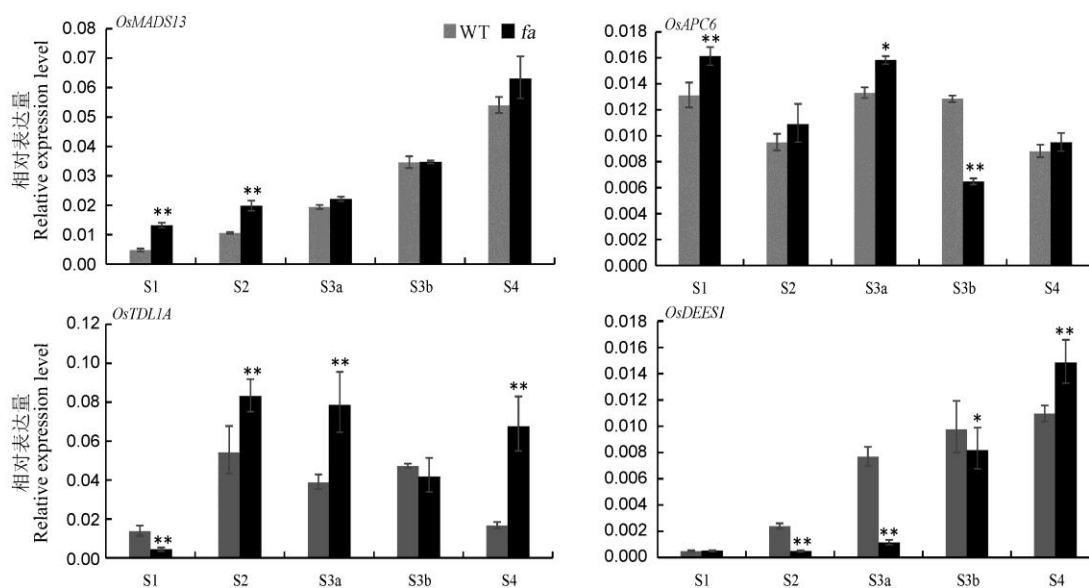


签和明场的合并。GFP 代表绿色荧光蛋白。标尺=100 μm 。

A, Subcellular localization of *FA-GFP* in tobacco epidermal cells; B, Localization of membrane marker in tobacco epidermal cells; C, Bright field of tobacco epidermal cell status; D, The merging of GFP, membrane marker and bright field. GFP indicates the green fluorescence of proteins. Bar=100 μm .

图 5 *FA* 蛋白在烟草中的亚细胞定位

Fig. 5. Subcellular localization of *FA* protein in tobacco.



野生型(WT)和突变体 *fa* 胚囊发育相关基因在不同时期的表达量。以 *OsUbiquitin* 作为对照, 误差线表示 $n=3$ 时的标准差。*和**分别代表野生型与突变体 *fa* 差异达 0.05 和 0.01 极显著水平(t 测验)。S1—孢原细胞形成期, S2—大孢子母细胞形成期, S3a—二分体时期, S3b—四分体时期, S4—功能大孢子形成期。

Expression levels of gene related to embryo sac development in the wild type (WT) and mutant *fa* at different stages. *OsUbiquitin* was used as an internal control; Error bars show SD ($n=3$). * and ** indicate significant difference between the wild type and *fa* mutant by t -test, respectively ($P<0.05$, $P<0.01$). S1, Archisporial cell stage; S2, Megaspore mother cell stage; S3a, Dyad stage; S3b, Tetrad stage; S4, Functional megaspore stage.

图6 野生型和 *fa* 突变体不同时期中胚囊相关基因的表达

Fig. 6. Expression of embryo sac related genes of the wild type and *fa* mutant at different stages.

中上升, 在 S3b 时期表达量下降, 而在 S4 时期无明显变化; 突变体中 *OsTDL1A* 表达量在除二分体时期外的所有时期均有所上升; 在 S1 时期 *OsDEES1* 表达量在突变体中无差异, 在 S2、S3a、S3b 时期显著下降, 而在 S4 时期显著上升。与野生型相比, 突变体 *fa* 在 S1 时期 *OsMADS13*、*OsAPC6*、*OsTDL1A* 表达量极显著变化, 而 *OsDEES1* 表达量无差异; 在 S2 时期中 *OsMADS13* 和 *OsTDL1A* 表达量极显著上升, 而 *OsDEES1* 基因表达量极显著下调, 但 *OsAPC6* 表达量无明显变化; 在减数分裂时期 S3a、S3b, *OsAPC6* 和 *OsTDL1A* 在 S3a 时期表达量上升, 在 S3b 时期表达下调; *OsDEES1* 在减数分裂时期表达量极显著下调, *OsMADS13* 在减数分裂阶段表达量无明显变化; 在功能大孢子形成时期, *OsTDL1A* 和 *OsDEES1* 表达量上调(图6)。总之, 相对于其他三个基因, *OsDEES1* 基因在突变体 *fa* 胚囊中表达量变化最为显著, 说明突变导致 *OsDEES1* 基因表达量的改变, *FA* 可能作为 *OsDEES1* 的上游基因。

3 讨论

深入了解水稻生殖器官的发育和分子调控机理对于水稻生长发育具有重要意义。由于雌配子异

常突变体往往导致植株的死亡, 以及子房壁的影响制约雌配子分子机制的研究^[4]。Nonomura 等^[10]研究发现 *msp1* 突变体表现出完全雄性不育, *MSP1* 参与了花粉囊壁的形态建成; 同时发现该基因会影响大孢子母细胞数量, 从而影响雌性的育性, 但通过授野生型花粉突变体能够结实。*OsTDL1A* 能与 *MSP1* 的 LRR 结构域结合在胚珠中共表达, 然后促进壁细胞进入中间层和绒毡层, 这些蛋白质还限制了水稻花药发育期间多余的造孢细胞。*OsTDL1A*-*MSP1* 信号途径可以通过直接或间接改变编码 *bHLH*、*bZIP* 转录因子和氧化还原相关蛋白的众多基因的表达来决定花药细胞命运^[11-13]。

本研究中 *FA* 基因与 *MSP1* 等位, 但突变位点不同^[10], 属于 *MSP1* 新等位基因。*fa* 突变体是在基因编码区的 3 221 bp 位置处发生突变, 此突变位点位于激酶结构域内, 而在类受体蛋白激酶基因家族中激酶结构域是主要的功能结构域, 能够激活胞内的级联反应。类受体蛋白激酶(RLK)包含胞外结合域、跨膜结构域、胞内激酶结构域, LRR-RLK 属于 RLK 其中的一类^[18]。LRR-RLK 参与植物生长发育调节, 拟南芥和水稻中有相关报道^[19-20]。已报道参与水稻生殖器官发育的 RLK 基因, 有 *FON1*^[21]、*DRUS1*^[22]、*DRUS2*^[22]、*TMS10*^[23] 和 *OsDEES1*^[3]。

FON1 对花序分生组织的分化和花器官的数目起到重要作用^[21]；*DRUS1* 和 *DRUS2* 协同作用于水稻配子体、小穗和颖花的发育，亚细胞定位于质膜^[22]；*TMS10* 编码 LRR-RLK，其激酶活性在高温下对花药发育和繁殖至关重要，定位于质膜^[23]；*OsDEES1* 参与胚囊发育，属于细胞膜蛋白^[3]。本研究 *FA* 蛋白同样被定位于质膜，这与其他 RLK 定位结果一致^[22-23,3]。拟南芥 *EXS/EMS1* 参与配子体发育，编码类受体蛋白激酶^[24-25]。Yu 等^[23] 从水稻已分离克隆了 *TMS10*，并证实激酶结构域的近膜结构域是激活激酶活性的关键因素。拟南芥提出了一个 LRR-RLK 可能的作用模式，LRR-RLK 的 LRR 结构域通过识别并结合配体(病原菌、激素信号等)，使胞内的激酶域结构发生改变，产生自身磷酸化或转磷酸作用，从而将胞外信号传递到胞内，LRR-RLK 可能形成异源二聚体，以促进对配体的识别和下游信号的传递^[26]。

由于前人主要集中于花药的研究^[10-11,13]，对雌蕊的研究相对较少，所以本研究主要针对败育的胚囊进行研究。本研究详细观察了野生型和突变体胚囊的发育过程，发现突变体 *fa* 成熟胚囊出现多核胚囊、退化的胚囊和空胚囊等其他类型的异常胚囊。根据凌定厚^[5]对雌性不育类型的划分，发现突变体 *fa* 属于雌蕊发育缺陷，具有雌性器官但胚囊发育异常的第二类雌性不育类型。同时，我们也观察到突变体中正常的成熟胚囊，这可能是突变体中有极少部分能形成正常的成熟胚囊。因此，以突变体为母本授野生型花粉能获得少量的杂种种子(表 2)，这也与前人报道相符^[10]。而突变体自交时并不能获得成熟种子，这说明该突变体雌雄发育异常，这与 Nonomura 等^[10]的报道一致。我们发现 *FA* 基因是组成性表达且在花药和胚囊中表达量最高，与网站预测一致，说明该基因能同时影响花药和胚囊的发育。*fa* 突变是否影响其他胚囊发育基因的表达，还需进一步研究。本研究利用 qRT-PCR 对影响胚囊发育的相关基因进行了定量分析，相对于 *OsMADS13*、*OsAPC6*、*OsTDL1A* 基因在突变体 *fa* 胚囊中表达量而言，*OsDEES1* 基因在突变体 *fa* 胚囊中表达量变化最为显著，说明突变体 *fa* 胚囊中 *OsDEES1* 基因表达量发生改变，*FA* 可能作为 *OsDEES1* 的上游基因。但是 *OsMADS13*、*OsAPC6*、*OsTDL1A* 基因在突变体 *fa* 胚囊中表达量发生了变化，这可能是由于突变体 *fa* 是从孢原细胞开始异常，从而导致其他生物过程中基因表达量发生改变。

OsDEES1 是一个细胞膜蛋白，调节雌配子发育，参与调节胚囊早期发育，在水稻有性生殖中发挥作用^[3]。*FA* 定位于质膜，结合胚囊发育相关基因的定量结果，*OsDEES1* 表达量变化最大，并且 *FA* 和 *OsDEES1* 都属于类受体蛋白激酶，只是两者属于不同类别，*FA* 属于 LRR-RLK 类别，而 *OsDEES1* 属于 WAK-RLK^[3]。结合本研究中 *FA* 基因调节前期胚囊发育，猜测这两基因间可能存在互作关系调节水稻胚囊的发育。这对后续研究基因间关于雌配子发育提供了新的研究方向。

参考文献：

- [1] Zhao L H, He J M, Lin H Y, Li Y Q, Liu R Y, Yang Z B, Qin Y. Comparative expression profiling reveals gene functions in female meiosis and gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2014, 80(4): 615-628.
- [2] Evans M M S. The *indeterminate gametophyte1* gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. *Plant Cell*, 2007, 19(1): 46-62.
- [3] Wang N, Huang H J, Ren S T, Li J J, Sun Y, Sun D Y, Zhang S Q. The rice wall-associated receptor-like kinase gene *OsDEES1* plays a role in female gametophyte development. *Plant Physiol*, 2012, 160(2): 696-707.
- [4] 官文祥, 邓赞, 李小旭, 吴为人, 郑燕. 水稻雌性不育分子机理研究进展. 分子植物育种, 2017, 15(2): 672-684.
- [5] Guan W X, Deng Y, Li X X, Wu W R, Zheng Y. Advances in research on molecular mechanism of female sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Plant Breed*, 2017, 15(2): 672-684. (in Chinese with English abstract)
- [6] 凌定厚, 马镇荣, 陈梅芳, 陈琬琰. 起源于体细胞培养的籼稻雌性不育突变. 遗传学报, 1991, 18(5): 446-451.
- [7] Ling D H, Ma Z H, Chen M F, Chen W Y. Female sterile mutant from somaclones in somatic cell culture of indica rice. *Acta Genet Sin*, 1991, 18(5): 446-451. (in Chinese with English abstract)
- [8] Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, Wisman E, Yanofsky M F. B and C floral organ identity function require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 2000, 405(6783): 200-203.
- [9] Dreni L, Jacchia S, Fornara F, Fornari M, Ouwerkerk P B F, An G, Colombo L, Kater M M. The D-lineage MADS-box gene *OsMADS13* controls ovule identity in rice. *Plant J*, 2007, 52(4): 690-699.
- [10] Li H F, Liang W Q, Yin C S, Zhu L, Zhang D B. Genetic interaction of *OsMADS3*, *DROOPING LEAF*, and *OsMADS13* in specifying rice floral organ identities and meristem determinacy. *Plant Physiol*, 2011, 156(1): 263-274.

- [9] Yamaguchi T, Nagasawa N, Kawasaki S, Matsuoka M, Nagato Y, Hirano H Y. The YABBY gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 500-509.
- [10] Nonomura K I, Miyoshi K, Eiguchi M, Suzuki T, Miyao A, Hirochika H, Kurata N. The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1728-1739.
- [11] Zhao X A, Palma J D, Oane R, Gamuyao R, Luo M, Chaudhury A, Herve P, Xue Q Z, Bennett J. OsTDL1A binds to the LRR domain of rice receptor kinase MSP1, and is required to limit sporocyte numbers. *Plant J*, 2008, 54(3): 375-387.
- [12] Hong L L, Tang D, Shen Y, Hu Q, Wang K J, Li M, Lu T G, Cheng Z K. MIL2 (MICROSPORELESS2) regulates early cell differentiation in the rice anther. *New Phytol*, 2012, 196(2): 402-413.
- [13] Li Y, Qian X L, Chen M J, Fei Q L, Meyers B C, Liang W Q, Zhang D B. Regulatory role of a receptor-like kinase in specifying anther cell identity. *Plant Physiol*, 2016, 171(3): 2085-2100.
- [14] Kumar M, Basha P O, Puri A, Rajpurohit D, Randhawa G S, Sharma T R, Dhaliwal H S. A candidate gene *OsAPC6* of anaphase-promoting complex of rice identified through T-DNA insertion. *Funct Integr Genom*, 2010, 10(3): 349-358.
- [15] Awasthi A, Paul P, Kumar S, Verma S K, Prasad R, Dhaliwal H S. Abnormal endosperm development causes female sterility in rice insertional mutant *OsAPC6*. *Plant Sci*, 2012, 183: 167-174.
- [16] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*, 1985, 5(2): 69-76.
- [17] 刘向东, 徐雪宾, 卢永根, 徐是雄. 水稻胚囊形成过程与分期. 中国水稻科学, 1997, 11(3): 141-150.
Liu X D, Xu X B, Lu Y G, Xu S X. The process of embryo sac formation and its stages dividing in rice. *Chin J Rice Sci*, 1997, 11(3): 141-150. (in Chinese with English abstract)
- [18] Shiu S H, Bleecker A B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 10 763-10 768.
- [19] Torii K U, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier R F, Komeda Y. The *Arabidopsis* *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell*, 1996, 8(6): 735-746.
- [20] Kim C H, Jeong D H, An G. Molecular cloning and characterization of *OsLRK1* encoding a putative receptor-like protein kinase from *Oryza sativa*. *Plant Sci*, 2000, 152(1): 17-26.
- [21] Suzaki T, Sato M, Ashikari M, Miyoshi M, Nagato Y, Hirano H Y. The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis* *CLAVATA1*. *Development*, 2004, 131(22): 5649-5657.
- [22] Pu C X, Han Y F, Zhu S, Song F Y, Zhao Y, Wang C Y, Zhang Y C, Yang Q, Wang J, Bu S L, Sun L J, Zhang S W, Zhang S Q, Sun D Y, Sun Y. The rice receptor-like kinases DWARF AND RUNTISH SPIKELET1 and 2 repress cell death and affect sugar utilization during reproductive development. *Plant Cell*, 2017, 29(1): 70-89.
- [23] Yu J P, Han J J, Kim Y J, Song M, Yang Z, He Y, Fu R F, Luo Z J, Hu J P, Liang W Q, Zhang D B. Two rice receptor-like kinases maintain male fertility under changing temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(46): 12327-12332.
- [24] Canales C, Bhatt A M, Scott R, Dickinson H. *EXS*, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2002, 12(20): 1718-1727.
- [25] Zhao D Z, Wang G F, Speal B, Ma H. The *EXCESS MICROSPOROCYTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev*, 2002, 16(15): 2021-2031.
- [26] Shin H S, Bleecker A B. Plant receptor-like kinase gene family: Diversity, function, and signaling. *Sci STKE*, 2001, 113: 22.