

# 类伸展蛋白 OsPEX1 对水稻花粉育性的影响

代航, 李延, 刘树春, 林磊, 吴娟燕, 张志杰, 彭崎春, 李楠, 张向前

华南农业大学林学与风景园林学院, 广州 510642

**摘要:** 类伸展蛋白(Leucine-Rich Repeats Extensins, LRX)是一类细胞壁嵌合蛋白, 其 N 端包含一个 LRR (leucine-rich repeats)结构域, C 端含 Extensins 结构域。研究表明, LRX 基因家族在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花粉萌发和花粉管生长过程中具有重要作用, 而水稻(*Oryza sativa* L.) LRX 基因家族是否在调控花粉发育方面具有保守的生物学功能尚不清楚。本研究首先进行了生物信息学分析, 结果显示, 水稻 LRX 基因家族包括 8 个成员, *OsPEX3*、*OsLRX3*、*OsLRX5* 位于水稻第 1 号染色体; *OsLRX1*、*OsLRX3*、*OsLRX2*、*OsPEX1* 和 *OsPEX2* 分别位于第 2、第 5、第 6、第 11 和第 12 号染色体, 其中 *OsPEX1* 基因在花粉中高表达, 暗示 *OsPEX1* 可能参与了花粉发育调控。为此, 本研究采用 RNAi 技术进一步研究了 *OsPEX1* 基因对花粉发育的影响。结果表明, *OsPEX1* 基因的 RNAi 转基因植株花粉败育, 结实率仅为 10%-30%。qRT-PCR 分析显示, 这些 RNAi 转基因植株 *OsPEX1* 基因表达量显著低于野生型, 而且其表达量越低花粉育性亦随之降低。上述研究结果表明, 水稻 *OsPEX1* 基因是水稻花粉发育的重要基因, 该基因的克隆和功能分析有助于进一步阐明水稻花粉发育调控的分子遗传学机制。

**关键词:** 水稻; 类伸展蛋白; 花粉育性

## Effect of extensin-like OsPEX1 on pollen fertility in rice

Hang Dai, Yan Li, Shunchun Liu, Lei Lin, Juanyan Wu, Zhijie Zhang, Qichun Peng, Nan Li, Xiangqian Zhang

College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** LRXs (leucine-rich repeat extensins) are chimeric cell wall proteins containing an N-terminal leucine-rich repeat (LRR) and a C-terminal extensin domain. Increasing evidences suggest that LRXs family genes play important roles in pollen germination and pollen tube growth in *Arabidopsis thaliana*. However, the functions of rice (*Oryza sativa* L.) LRX genes in pollen development remain poorly understood. Bioinformatics analysis showed that the rice LRX gene family consist of eight members, namely *OsPEX3*, *OsLRX3* and *OsLRX5* located on chromosome 1, *OsLRX1*, *OsLRX3*, *OsLRX2*, *OsPEX1* and *OsPEX2* located on chromosome 2, 5, 6, 11 and 12, respectively. The *OsPEX1* gene is preferentially expressed in rice anther, suggesting that it may be involved in the regulation of pollen development. Next, we further investigated the

收稿日期: 2020-09-17; 修回日期: 2020-12-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31671594)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31671594)]

作者简介: 代航, 在读硕士研究生, 专业方向: 农艺与种业。E-mail: 398035743@qq.com

通讯作者: 张向前, 博士, 教授, 研究方向: 植物分子育种。E-mail: aacrav@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-296

网络出版时间: 2021/3/2 17:09:27

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20210302.1123.001.html>

role of the *OsPEX1* gene in rice by knockdown of its expression using an RNAi approach. The *OsPEX1* RNAi transgenic lines showed a significant decrease in seed setting rate (10%~30%) due to pollen sterility. Further quantitative RT-PCR analysis indicated that the *OsPEX1* gene was significantly down-regulated in the RNAi transgenic lines. The results indicate that the *OsPEX1* plays an important role in the regulation of rice pollen development. Further studies on this gene could provide insights on the molecular and genetic mechanisms in this developmental process.

**Keywords:** rice; leucine-rich repeats extensins; pollen fertility

类伸展蛋白基因家族因其编码的蛋白含有 1 个富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeats, LRR)和 1 个伸展蛋白结构域, 该家族又称为 LRX 家族(leucine-rich repeats extensins)<sup>[1,2]</sup>。LRX 蛋白在植物生长发育中具有重要作用, 根据系统发生关系和表达模式可以将 LRX 基因分为 2 类: 主要在营养组织中表达的基因, 通常用 LRX 表示; 主要在繁殖器官中高表达的基因, 通常用 PEX (*Pollen extension-like*) 表示<sup>[3]</sup>。

LRX 蛋白的功能众多, 除了促进细胞生长外, 还影响营养生长、形态发生、授粉受精<sup>[4,5]</sup>等, 随细胞基质不同具有不同的功能, 并表现出高度的组织、器官和细胞特异性<sup>[6]</sup>。通过对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的研究, 发现 *AtLRX1* 直接参与了细胞壁的形成<sup>[2]</sup>; 在玉米(*Zea mays* L.)花粉中 *Zmpex1* 蛋白也可能作为与雌蕊结合子相互作用的识别因子<sup>[1]</sup>。近来研究表明, 拟南芥类伸展蛋白 LRX3/4/5 能够与植物多肽类激素(rapid alkalization factor, RALF) RALF22/23 互作, 而 RALF 与质膜定位的受体 FER 互作调控盐胁迫<sup>[7]</sup>。此外, 花粉表达的 ANX1/2 和 BUPS1/2 与 *AtRALF4/19* 互作, 而 *AtRALF4/19* 能与 *AtLRX8/9* 互作调控拟南芥花粉管伸长<sup>[8,9]</sup>。拟南芥 LRX4 的 LRR 功能域能够与 CrRLK1L (*Catharanthus roseus* receptor-like kinase)家族成员 FERONIA (FER) 直接互作, 表明类伸展蛋白与 CrRLK1L 家族成员可能存在直接联系<sup>[10]</sup>。考虑到 CrRLK1L 受体类激酶亚家族成员例如 FER、ANXURs (ANX1/ANX2) 和 BUDDHA'S PAPER SEAL1, 2 (BUPS1/BUPS2)可能是潜在的细胞壁感应器<sup>[11]</sup>, 这些 CrRLK1L 蛋白跨细胞质膜定位能够连接质外体和细胞质, 在各种细胞过程有多重功能<sup>[12]</sup>。上述研究表明, 类伸展蛋白可能参与了细胞壁与细胞表面信号的传导过程<sup>[13]</sup>。

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上最重要的粮食作

物之一, 是单子叶植物基因组研究的模式植物。目前, 类伸展蛋白在水稻发育调控功能方面的研究还比较薄弱, 尚无 LRX 类伸展蛋白调控水稻育性方面的相关报道。本研究在生物信息学分析的基础上通过 RNAi 方法对水稻 *OsPEX1* 基因(LOC\_Os11g43640)进行了育性相关研究, 发现水稻类伸展蛋白基因 *OsPEX1* 在水稻花粉发育方面具有重要的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究转化所用的水稻材料是粳稻品种中花 11, 其种子来自于广东省植物分子育种重点实验室。

### 1.2 生物信息学分析

以拟南芥中已知的 LRX 基因(*AtLRX1*, *At1g12040*) 序列检索水稻基因组注释数据库 MSU rice genome annotation release 7(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), 搜索水稻的同源基因, 并分析水稻中 LRX 类基因在染色体上的位置。根据数据库中的注释信息, 绘制水稻 LRX 基因家族各基因结构图, 利用 TBtools<sup>[14]</sup> 绘制 LRX 基因的表达分析谱。

### 1.3 RNAi 载体的构建

按照 TransZolTMUp 试剂盒说明书提取水稻组织总 RNA, 并将检测合格的 RNA 反转录合成第一链 cDNA。以反转录的水稻叶片单链 cDNA 为模板, 设计并合成特异性引物(p1390-KD-PEX-F: 5'-AC-GCGTGGATCCAGGAGTCACCTGAGGAACCA-3'; p1390-KD-PEX1-R: 5'-CTGCAGAAGCTTATTCTT-CTGGAGTCGGTGGA-3'), 扩增目的片段, 回收之后将目的基因片段反向连接到植物表达载体

pCAMBIA1390-Ubi, 构建 RNAi 表达载体 p1390-KD-PEX1。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂板过夜培养后挑选单菌落进行测序, 挑选测序正确的质粒转化到农杆菌 EHA105, 用于遗传转化。

#### 1.4 农杆菌介导的遗传转化

参照王玉珍等<sup>[15]</sup>介绍的方法, 用含有目的质粒的农杆菌菌液侵染中花 11 种子诱导的愈伤组织, 之后对侵染的愈伤组织进行抗性筛选以及抗性愈伤组织的分化生根, 最后对幼苗进行炼苗和移栽。

#### 1.5 转基因植株检测

对遗传转化得到的转基因植株, 按照张向前等<sup>[16]</sup>介绍的方法进行 DNA 的快速提取, 通过潮霉素 *Hyg* 抗性基因 PCR 扩增检测是否为转基因阳性植株。

#### 1.6 转基因植株基因表达分析

水稻花粉总 RNA 的提取利用 TransZolTMUp 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)进行, 采用 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 引物(RT-OsPEX1-F: 5'-GAGATGGGCTACCTGCAGAACA-3'; RT-OsPEX1-R: 5'-GTAGGCGAAGCTGAAGTTGACG-3'), 以 *Actin* (*Actin*-F: 5'-GATCACTGCCTTGGCTCCTA-3'; *Actin*-R: 5'-GTACTCAGCCTTGGCAATCC-3')作为内参, 分析野生型和 RNAi 转基因植株 *OsPEX1* 基因在花粉中的相对表达量。采用 TaKaRa SYBR Primer Ex Taq II(Perfect Real Time)试剂盒进行 Real-time PCR 扩增。在冰上配制 Real-time PCR 反应体系, 重复 3 次。反应体系如下: 2 $\times$ SYBR Premix Ex TaqI 10  $\mu$ L, 引物 F (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, 引物 R (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L; cDNA 模板 10 ng, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。

#### 1.7 转基因植株表型观测

收集 T<sub>0</sub> 代转基因植株的种子, 连续自交种植两季之后观测 T<sub>2</sub> 代表型。RNAi 转基因植株结实率统计: 转基因水稻 T<sub>2</sub> 代成熟后, 统计每株各个稻穗的谷粒总数及实粒数。每穗结实率=实粒数/谷粒总数。单株结实率为每穗结实率的平均值。

花粉染色: RNAi 转基因植株和野生型抽穗后, 取主穗中上部花药长度超过谷壳长度 2/3 的成熟顶端颖花 4-5 朵, 置于 FAA (70%乙醇: 冰乙酸: 甲醛=

89: 6: 5) 固定液中固定保存。碘-碘化钾(I<sub>2</sub>-KI)溶液染色后在普通光学显微镜下进行观察。根据花粉粒的形状、大小和着色情况将花粉分为可育花粉和败育花粉两种类型, 可育花粉呈圆球形, 积累淀粉较多, 通常被 I<sub>2</sub>-KI 染成深蓝色。而败育花粉常表现出畸形, 往往不含淀粉或积累淀粉较少, 被 I<sub>2</sub>-KI 染成黄褐色。每朵颖花取 3 个视野, 每株观察 3 朵颖花, 共 9 个视野, 观察花粉染色情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻 LRX 基因家族在染色体上的分布

本研究以拟南芥中已知的 *LRX* 基因(*AtLRX1*、*Atlg12040*)蛋白序列为模板搜索水稻的同源基因。在水稻基因组注释数据库 MSU rice genome annotation release 7(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)中, 共找到 8 个 *LRX* 类基因, 分布于第 1、2、5、6、11、12 号染色体上, 其中第 1 号染色体上最多, 有 3 个成员, 分别是 *OsPEX3*、*OsLRX4* 和 *OsLRX5*; 其他 5 条染色体上各有 1 个成员, 分别是位于 2 号染色体上的 *OsLRX1*, 位于 5 号染色体上的 *OsLRX3*, 位于 6 号染色体上的 *OsLRX2*, 位于 11 号染色体上的 *OsPEX1* 和位于 12 号染色体上的 *OsPEX2* (图 1)。

### 2.2 水稻 LRX 基因家族生物信息学分析

根据上述水稻基因组注释数据库上的注释信息, 得到水稻 8 个 *LRX* 类基因的 5'到 3'的序列信息。这 8 个基因的基因结构如图 2 所示。其中 *OsPEX1*、*OsPEX3*、*OsLRX1*、*OsLRX2*、*OsLRX3*、*OsLRX4* 和 *OsLRX5* 的编码区只包含一个外显子, 不存在内含子序列; 而 *OsPEX2* 基因的编码序列包含两个外显子和一个内含子。编码蛋白质长度在 455 aa~1399 aa 之间, 其中 *OsPEX1* 编码的蛋白最长(1399 aa)。

根据其表达模式(图 3), 水稻中的 8 个 *LRX* 基因可以分为两组: *OsPEX1*、*OsPEX2*、*OsPEX3* 和 *OsLRX5* 主要在生殖器官中表达(尤其在花药中), 在营养器官中表达量较低或者不表达; *OsLRX1*、*OsLRX2*、*OsLRX3* 和 *OsLRX4* 在生长的各个时期均有表达, 其中 *OsLRX5* 在营养器官及生殖器官中均有表达但是表达量较低。这也暗示着两组基因可能

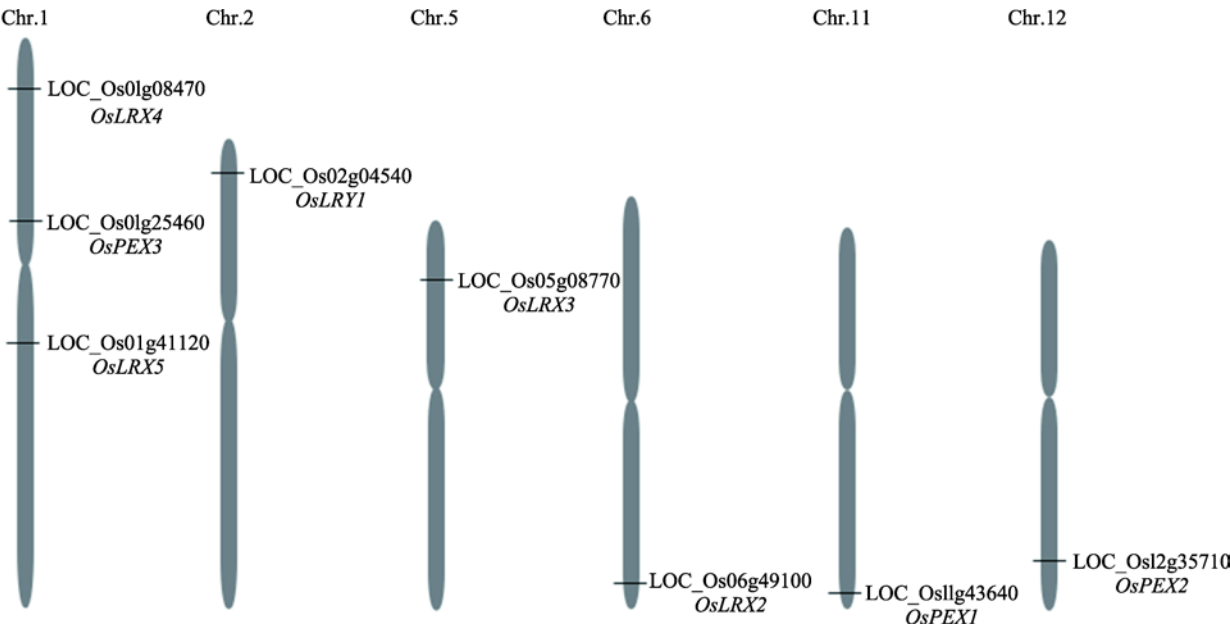


图 1 水稻类伸展蛋白基因在染色体位置示意图

Fig. 1 Chromosomal locations of LRXs on the rice genome

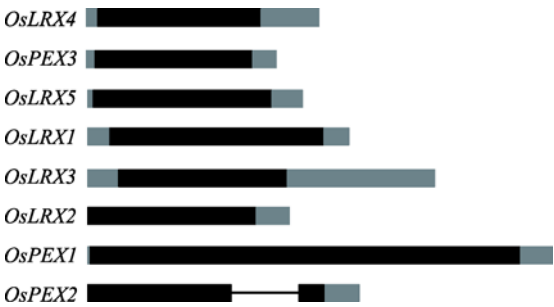


图 2 水稻类伸展蛋白基因结构

Fig. 2 Gene structure of the 8 LRXs in rice

黑色区域：外显子；黑色线：内含子；灰色区域：非编码区。

在不同的生长时期，参与水稻生长发育的调节。

### 2.3 水稻 *OsPEX1* 基因 RNAi 转基因植株的获得

表达谱分析表明，水稻中 PEX 类基因在花药中高表达，这说明此类基因可能与花药的形成与发育相关。为了探究 PEX 类基因与花药发育的关系，本研究利用 RNAi 方法对 *OsPEX1* 基因进行了功能研究。

本研究通过构建 *OsPEX1* 基因的 RNAi 表达载体，利用农杆菌介导转化的方法转化粳稻品种中花

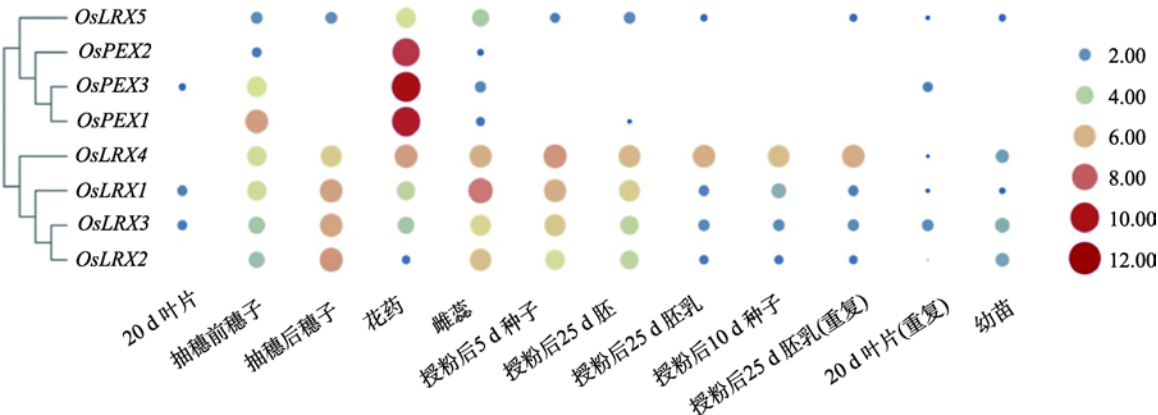


图 3 水稻类伸展蛋白基因表达模式

Fig. 3 Expression pattern of the 8 LRXs gene in rice

11, 获得 RNAi 转基因植株。转基因 T<sub>0</sub> 代共获得 40 株, 用潮霉素基因 *Hyg* 特异引物进行 PCR 扩增, 检测 T<sub>0</sub> 代植株(图 4), 共获得 25 株转基因阳性株。

## 2.4 水稻 *OsPEX1* 基因 RNAi 转基因植株表型特征

对水稻 *OsPEX1* 基因 RNAi 转基因植株表型进行分析, 结果显示, 与野生型中花 11 相比, 所有转基因植株的结实率显著降低, 结实率在 10%~30% 之间, 个别植株甚至完全不育(图 5, A 和 B)。基因表达分析结果显示, 转基因植株的育性与 *OsPEX1* 基因的表达量呈现出正相关性, 即 *OsPEX1* 的表达量越低, 其对应植株的结实率越低(图 5, B 和 C)。

为了进一步阐释 *OsPEX1* 影响水稻结实率的原因, 本研究对转基因 T<sub>2</sub> 代植株的花粉育性进行统计观察。与野生型可育花粉相比, 转基因阳性植株的

花粉育性显著降低(图 6)。转基因阳性植株的花粉形态不规则, 不能被 I<sub>2</sub>-KI 着色, 呈现出雄性不育特征(图 6)。综上所述, *OsPEX1* 可能在水稻花药、花粉发育中起到了至关重要的作用, 降低 *OsPEX1* 的表达, 会影响花粉的正常发育, 进而导致结实率降低。

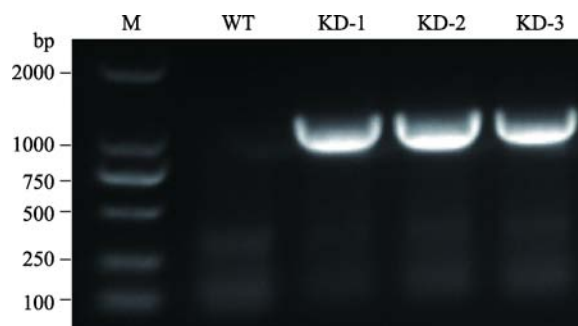


图 4 转基因植株 PCR 检测

Fig. 4 Detection of transgenic plants by PCR

M: DL2000 Marker; WT: 野生型植株; KD: RNAi 转基因植株。

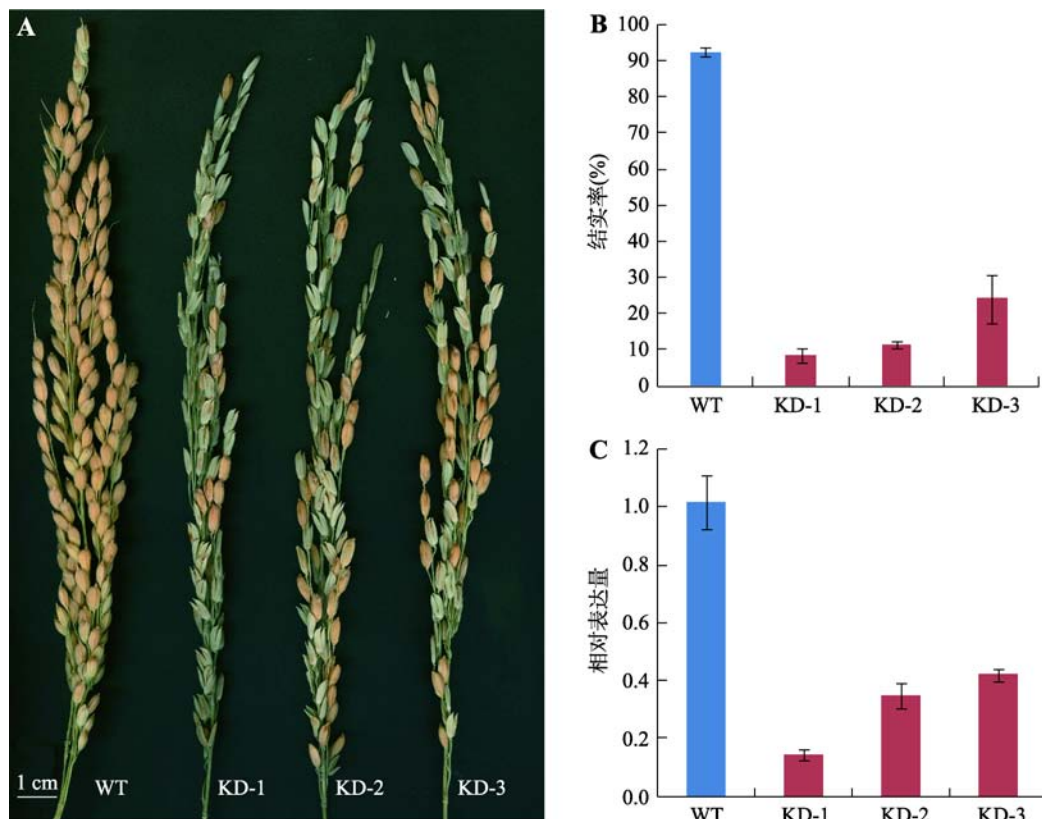


图 5 水稻野生型和 *OsPEX1* 基因 RNAi 转基因植株表型及其表达分析

Fig. 5 Phenotypes of wild type and transgenic rice plants with RNAi-mediated knock-down of *OsPEX1* expression and expression analysis of *OsPEX1* in the transgenic plants

A: 野生型和转基因 RNAi 植株的主穗; B: 野生型和转基因 RNAi 植株的单穗结实率; C: 野生型和转基因 RNAi 植株中 *OsPEX1* 基因的相对表达量。WT: 野生型植株; KD: RNAi 转基因植株。

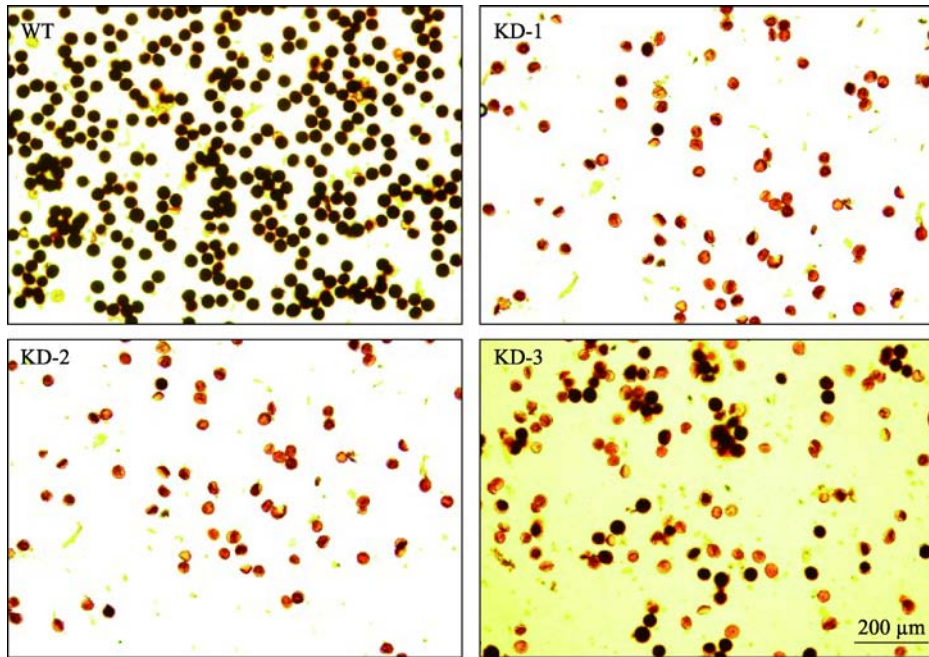


图 6 水稻野生型和 *OsPEX1* 基因 RNAi 转基因  $T_2$  代植株花粉  $I_2$ -KI 染色

Fig. 6  $I_2$ -KI staining of pollen grains in wild type and  $T_2$  transgenic plants generated by RNAi-mediated knock-down of *OsPEX1* expression

WT: 野生型植株; KD: RNAi 转基因植株。

### 3 讨论

在开花植物中,花粉发育是一个非常复杂的生物学过程<sup>[17]</sup>。小孢子母细胞在花粉囊中减数分裂产生小孢子,进一步发育成花粉粒,花粉粒成熟后从花药中释放出来<sup>[18]</sup>。高等植物小孢子所处的花粉囊被来源于体细胞绒毡层中的糖类和脂类所填充,进而提供了花药早期发育所需的营养物质<sup>[19]</sup>。目前,关于花粉育性基因相关调控机制的研究主要涉及花粉败育和花粉缺失相关基因<sup>[20-24]</sup>。其中,花粉败育是指,花粉受内外环境因素影响而不能正常发育,主要原因是花粉母细胞不能正常减数分裂和绒毡层细胞异常<sup>[25]</sup>。在雄性不育系小麦 S-1376 中,不育系花药绒毡层细胞提前至四分体时期降解,并在各发育时期伴随着多糖、脂类和蛋白质等物质异常分布和积累,致使小孢子在由单核晚期向二核期发育的过程中物质供应不足,使得小孢子细胞核分裂异常,最终表现为花粉败育<sup>[26]</sup>。在 *wda1* (*Wax-deficient anther1*) 突变体中,在花药的外层不存在表皮蜡状晶体,并且由于突变体花粉中花粉外壁形成的缺陷,小孢子的发育被严重阻碍并最终被破坏从而导致花

粉败育<sup>[27]</sup>。对于水稻花粉半不育性突变体 *pss1* (*pollen semi-sterility1*),由于 *PSS1* 编码的蛋白缺失,使得花粉减数分裂减弱,花粉生活力降低,表现出半不育性<sup>[22]</sup>。突变体 *udt1* (*undeveloped tapetum1*) 的绒毡层不能分化和液泡化,并且小孢子母细胞不能分裂成小孢子,中间层细胞不退化,因而花粉囊不能产生正常花粉<sup>[28]</sup>。最新研究表明,拟南芥 *rad23* (*Radiation sensitive 23*) 突变体通过促进细胞周期关键蛋白 KRP1 的降解,在花粉发育中发挥重要作用<sup>[29]</sup>。通过对一个水稻雄性不育突变体 *Oslecrk5* (*Lectin Receptor-like kinase5*) 的研究发现,该突变体在减数分裂过程中出现胼胝质沉积缺陷,而胼胝质的异常沉积会导致小孢子败育<sup>[30]</sup>。这些基因的发现以及功能研究,使人们对花粉育性相关的调控机制有了更深入的认识。

花粉成熟后,花药破裂,花粉释放,经过风力或昆虫的作用落到同一朵花或另一朵花雌蕊柱头上,引发一系列复杂的细胞形态变化和生理生化变化,其中花粉萌发、花粉管生长对于双受精的完成至关重要<sup>[31]</sup>。对拟南芥 *AtLRX8-11* 的研究表明,LRX 蛋白参与了花粉管的生长以及花粉管细胞壁完整性的

维持。通过分析 *AtLRX8*、*AtLRX9*、*AtLRX10* 和 *AtLRX11* 这 4 个基因的三突变体和四突变体在花粉以及花粉管中的表达,发现这些 LRX 蛋白与花粉的萌发以及花粉管的生长密切相关。突变体的花粉管细胞壁组装受到严重影响,胼胝质和果胶过度积累,导致花粉管异常膨大和破裂等<sup>[32~34]</sup>。花粉管细胞壁成分的变化可能与囊泡运输有关,而花粉管的破裂可能与  $\text{Ca}^{2+}$  的含量有关<sup>[33]</sup>。

LRX 蛋白同源比对表明,水稻类伸展蛋白有 8 个,第 1 染色体有 3 个,第 2、5、6、11、12 染色体各有 1 个。目前,水稻类伸展蛋白调控植物生长发育的机理研究还比较薄弱,尚无水稻 LRX 类伸展蛋白调控花粉发育的相关报导。植物除了具有复杂的膜信号系统,还拥有细胞壁信号传导途径,使其能够感知、传导细胞壁状态以及细胞壁组份变化,以便更好的协调植物生长发育和提高植物适应环境变化的能力<sup>[35]</sup>。近来研究表明,拟南芥花粉表达的 LRX 蛋白 *AtLRX8/9* 能够与植物快速碱化因子 *AtRALF4/19* 互作,而 *AtRALF4/19* 进一步通过与 *CrRLK1L* 受体类激酶互作共同调控拟南芥花粉管萌发和伸长<sup>[9,32~34]</sup>。这些研究表明,细胞壁 LRX 蛋白可能通过 LRX-RALF-CrRLK1L 途径参与了植物细胞信号转导过程。水稻基因组有 16 个 *CrRLK1L* 受体类激酶家族成员,而 RALF 家族成员超过 40 个 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)。鉴于植物 LRX、*CrRLK1L* 以及 RALF 蛋白家族的保守性,水稻类伸展蛋白 OsPEX1 应该也有类似的分子调控模式,但有待于进一步证明。

本研究的 *OsPEX1* RNAi 转基因植株花粉败育,结实率显著降低,有别于目前已报道的花粉不育变异材料。水稻 *OsPEX1*(LOC\_Os11g43640)是 1 个类伸展蛋白编码基因,*OsPEX1* 不同于已克隆的花粉发育相关基因。综上分析可知,本研究所关注的水稻 *OsPEX1* 基因是调控水稻花粉发育的新基因,该基因的克隆和功能分析有助于进一步理解水稻花粉发育调控的分子遗传学机制。

## 参考文献(References):

- [1] Rubinstein AL, Broadwater AH, Lowrey KB, Bedinger PA. *Pex1*, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995,92(8): 3086–3090. [DOI]
- [2] Baumberger N, Ringli C, Keller B. The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 2001, 15(9): 1128–1139. [DOI]
- [3] Baumberger N, Doesseger B, Guyot R, Diet A, Parsons RL, Clark MA, Simmons MP, Bedinger P, Goff SA, Ringli C, Keller B. Whole-genome comparison of leucine-rich repeat extensins in *Arabidopsis* and rice. A conserved family of cell wall proteins form a vegetative and a reproductive clad. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 1313–1326. [DOI]
- [4] Wang XX. Functional characterization of *Arabidopsis* pollen-specific expressed LRXs in pollen germination and pollen tube growth[Dissertation]. *Hebei Normal Univ*, 2017.  
王笑笑. 拟南芥花粉特异表达的 LRXs 蛋白在花粉萌发和花粉管生长过程中的功能研究[学位论文]. 河北师范大学, 2017. [DOI]
- [5] Lu ZX, Su L, Shan L, Bi YP. Research advances in LRR-Extensin family of *Arabidopsis*. *J Anhui Agric Sci*, 2006, 34(23): 6148–6150.  
鲁朝霞, 苏磊, 单雷, 毕玉平. 拟南芥 LRR-Extensin 蛋白家族的研究. *安徽农业科学*, 2006, 34(23): 6148–6150. [DOI]
- [6] Campbell L, Turner, SR. A Comprehensive analysis of RALF proteins in green plants suggests there are two distinct functional groups. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 37. [DOI]
- [7] Zhao CZ, Zayed O, Yu ZP, Jiang W, Zhu PP, Hsu Chuan-Chih, Zhang LR, Tao WA, Lozano-Durán R, Zhu Jian-Kang. Leucine-rich repeat extensin proteins regulate plant salt tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(51): 13123–13128. [DOI]
- [8] Ge Z, Bergonci T, Zhao Y, Zou Y, Du S, Liu MC, Luo X, Ruan H, Garcia-Valencia LE, Zhong S, Hou S, Huang Q, Lai L, Moura DS, Gu H, Dong J, Wu HM, Dresselhaus T, Xiao J, Cheung, AY, Qu LJ. *Arabidopsis* pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. *Science*, 2017, 358(6370): 1596–1600. [DOI]
- [9] Mecchia MA, Santos-Fernandez G, Duss NN, Somoza SC, Boisson-Dernier A, Gagliardini V, Martinez-Bernardini A, Fabrice TN, Ringli C, Muschietti JP, Grossniklaus U. RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Science*, 2017, 358(6370): 1600–1603. [DOI]

[1] Rubinstein AL, Broadwater AH, Lowrey KB, Bedinger PA. *Pex1*, a pollen-specific gene with an extensin-like domain.

- [10] Herger A, Gupta S, Kadler G, Franck CM, Boisson-Dernier A, Ringli C. Overlapping functions and protein-protein interactions of LRR-extensins in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2020, 16(6): e1008847. [DOI]
- [11] Marzol E, Borassi C, Bringas M, Sede A, Rodríguez García DR, Capece L, Estevez JM. Filling the gaps to solve the extensin puzzle. *Mol Plant*, 2018, 11(5): 645–658. [DOI]
- [12] Nguyen QN, Lee YS, Cho LH, Jeong HJ, An G, Jung KH. Genome-wide identification and analysis of Catharanthus roseus RLK1-like kinases in rice. *Planta*, 2015, 241(3): 603–613. [DOI]
- [13] Nissen KS, Willats WGT, Malinovsky FG. Understanding CrRLK1L function: cell walls and growth control. *Trends Plant Sci*, 2016, 21(6): 516–527. [DOI]
- [14] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202. [DOI]
- [15] Wang YZ, Luo JL, Xu J, Liu XL. Agrobacterium-mediated genetic transformation and plant regeneration in rice. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2005, 20(1): 8–11.  
王玉珍, 罗景兰, 徐进, 刘香玲. 农杆菌介导的水稻遗传转化与植株再生. 华北农学报, 2005, 20(1): 8–11. [DOI]
- [16] Zhang XQ, Zhou JS, Zhu HT, Li X Y, Zeng R Z. Genetic analysis and gene mapping of an early flowering and multi-ovary mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditas (Beijing)*, 2008, 30(10): 1349–1355.  
张向前, 邹金松, 朱海涛, 李晓燕, 曾瑞珍. 水稻早熟多子房突变体 *fon5* 的遗传分析和基因定位. 遗传, 2008, 30(10): 1349–1355. [DOI]
- [17] Xie YY, Tang JT, Yang BW, Hu J, Liu YG, Chen LT. Current advance on molecular genetic regulation of rice fertility. *Hereditas (Beijing)*, 2019, 41(8): 703–715.  
谢勇尧, 汤金涛, 杨博文, 胡骏, 刘耀光, 陈乐天. 水稻育性调控的分子遗传研究进展. 遗传, 2019, 41(8): 703–715. [DOI]
- [18] Ma H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 393–434. [DOI]
- [19] Pacini E, Guarnieri M, Nepi M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma*, 2006, 228(1–3): 73–77. [DOI]
- [20] Yamagata Y, Yamamoto E, Aya K, Win K T, Doi K, Sobrizal, Ito T, Kanamori H, Wu J, Matsumoto T, Matsuoka M, Yoshimura A. Mitochondrial gene in the nuclear genome induces reproductive barrier in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(4): 1494–1499. [DOI]
- [21] Ueda K, Yoshimura F, Miyao A, Hirochika H, Nonomura K, Wabiko H. *Collapsed abnormal pollen1* gene encoding the arabinokinase-like protein is involved in pollen development in rice. *Plant Physiol*, 2013, 162(2): 858–871. [DOI]
- [22] Zhou SR, Wang Y, Li WC, Zhao ZG, Ren YL, Wang Y, Gu SH, Lin QB, Wang D, Jiang L, Su N, Zhang X, Liu LL, Cheng ZJ, Lei CL, Wang JL, Guo XP, Wu FQ, Ikehashi H, Wang HY, Wan JM. Pollen semi-sterility1 encodes a kinesin-1-like protein important for male meiosis, anther dehiscence, and fertility in rice. *Plant Cell*, 2011, 23(1): 111–129. [DOI]
- [23] Wu LN, Guan YS, Wu ZG, Yang K, Lv J, Converse R, Huang YX, Mao JX, Zhao Y, Wang ZW, Min HQ, Kan DY, Zhang Y. *OsABCG15* encodes a membrane protein that plays an important role in anther cuticle and pollen exine formation in rice. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(11): 1881–1899. [DOI]
- [24] Tang JY, Chu CC. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. *Nat Plants*, 2017, 3(7): 17077. [DOI]
- [25] Glover J, Grelon M, Craig S, Chaudhury A, Dennis E. Cloning and characterization of *MS5* from *Arabidopsis*: a gene critical in male meiosis. *Plant J*, 1998, 15(3): 345–356. [DOI]
- [26] Zhang PF, Song YL, Zhang GS, Zhao XL, Ba QS, Liu HZ, Zhu WW, Li ZK, Wang JW, Niu N. Relationship between abnormal metabolism of tapetum and microspore abortion in male sterile line of wheat. *Sci Agric Sin*. 2014, 47(09): 1670–1680.  
张鹏飞, 宋瑜龙, 张改生, 赵新亮, 巴青松, 刘红占, 祝万万, 李志宽, 王军卫, 牛娜. 小麦雄性不育系绒毡层异常代谢与小孢子败育的关系. 中国农业科学, 2014, 47(09): 1670–1680. [DOI]
- [27] Jung KH, Han MJ, Lee DY, Lee YS, Schreiber L, Franke R, Faust A, Yephremov A, Saedler H, Kim YW, Hwang I, An G. Wax-deficient *anther1* is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 3015–3032. [DOI]
- [28] Li N, Zhang DS, Liu HS, Yin CS, Li XX, Liang WQ, Yuan Z, Xu B, Chu HW, Wang J, Wen TQ, Huang H, Luo D, Ma H, Zhang DB. The rice tapetum degeneration

- retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 2999–3014. [\[DOI\]](#)
- [29] Li L, Li B, Xie C, Zhang T, Borassi C, Estevez JM, Li XS, Liu X. *Arabidopsis* RAD23B regulates pollen development by mediating degradation of KRP1. *J Exp Bot*, 2020, 71(14): 4010–4019. [\[DOI\]](#)
- [30] Wang B, Fang RQ, Zhang J, Han JL, Chen FM, He FR, Liu YG, Chen LT. Rice LecRK5 phosphorylates a UGPase to regulate callose biosynthesis during pollen development. *J Exp Bot*, 2020, 71(14): 4033–4041. [\[DOI\]](#)
- [31] Ma L, Xu W, Dou LL, Ke XN, Liu MY, Geng YF, Huang X, Jia YF, Liu QP. Research progress on pollen fertility-related genes in rice (*Oryza sativa* L.) *Jiangsu Agri Sci*, 2019, 47(10): 42–47.  
马龙, 徐薇, 窦玲玲, 柯笑楠, 刘明月, 耿艳飞, 黄霞, 贾玉芳, 刘庆坡. 水稻花粉育性相关基因研究进展. *江苏农业科学*, 2019, 47(10): 42–47. [\[DOI\]](#)
- [32] Sede AR, Borassi C, Wengier DL, Mecchia MA, Estevez JM, Muschietti JP. *Arabidopsis* pollen extensins LRX are required for cell wall integrity during pollen tube growth. *Febs Lett*, 2018, 592(2): 233–243. [\[DOI\]](#)
- [33] Fabrice TN, Vogler H, Draeger C, Munglani G, Gupta S, Herger AG, Knox P, Grossniklaus U, Ringl, C. LRX proteins play a crucial role in pollen grain and pollen tube cell wall development. *Plant Physiol*, 2018, 176(3): 1981–1992. [\[DOI\]](#)
- [34] Wang XX, Wang KY, Yin GM, Liu XY, Liu M, Cao NN, Duan YZ, Gao H, Wang WL, Ge WN, Wang J, Li R, Guo Y. Pollen-expressed leucine-rich repeat extensins are essential for pollen germination and growth. *Plant Physiol*, 2018, 176(3): 1993–2006. [\[DOI\]](#)
- [35] Borassi C, Sede AR, Mecchia MA, Salgado Salter JD, Marzol E, Muschietti JP, Estevez JM. An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. *J Exp Bot*, 2016, 67(2): 477–448. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 储成才)