

# SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

# 学士学位论文

BACHELOR'S THESIS



论文题目: 水稻 EAT1 和 TDR 参与调控花粉外壁的发育过程

学生姓名:	罗人和
学生学号:	5110109094
专业:	生物科学(理科基地班)
指导教师:	许 杰
学院(系):	生命科学技术学院



#### 摘要

花粉外壁是植物花粉表面特有结构,其不但对植物雄性细胞具有重要的保护 作用, 也是植物授粉过程中雌雄识别的重要物质基础。尽管目前在水稻中已经发 现了 20 多个转录因子、代谢酶和运输蛋白参与了花粉外壁主要物质孢粉素的形 成和转运过程,但这些关键转录因子如何有效调控代谢酶和转运蛋白参与花粉外 壁的发育过程仍然很不清楚。我们实验室前期分别克降和报道了在水稻花药特异 表达的两个 bHLH 类转录因子 TAPETUM DEGENERATION RETARDATION (TDR)和 ETERNAL TAPETUM 1 (EAT1),它们分别参与了孢粉素的形成和绒毡 层的降解过程,且发现二者转录水平上属于上下游、在蛋白水平上存在相互作用。 本研究进一步利用电子显微镜分析,证明了 EAT1 的缺失可能影响了乌氏体的正 常形成、从而导致花粉外壁柱状层缺失;转录组分析结果显示,在 eat1 突变体 中至少有 1192 个基因表达发生改变,主要参与了脂类的代谢和运输过程;烟草 瞬间转化双荧光素酶报告实验验证了脂转运蛋白 LTPL64、LTPL68/OsC6 等相关 基因受 EAT1 和 TDR 共同调控;利用 RNAi 干扰方法,证明了 LTPL64 在转录水 平上的表达降低,也可以导致花粉外壁柱状层缺失,乌氏体发育异常等类似 eat1 的遗传学表型。通过以上研究结果,我们初步阐明了 EAT1 和 TDR 可以通过形 成同源或异源二聚体的形式,来完成花粉外壁形成过程中的基因表达的精细和严 格调控,相关研究结果将为水稻花粉外壁发育分子机制的研究提供理论基础。

关键词: 水稻,花粉外壁发育,TDR,EAT,基因调控



# THE COOPERATION OF TDR & EAT1 IN REGULATING THE POLLEN EXINE DEVELOPMENT OF RICE

### ABSTRACT

Pollen wall is a specific structure covered pollens. It helps pollens to keep the reproductive activity and also plays important role during pollen-stigma recognition. Now nearly twenty genes including transcription factors, enzymes, transfer proteins have been reported to involve in the sporopollenin formation and transport. But how these transcription factors cooperate together to regulate the metabolism and transport of lipid precursors during pollen wall development is still unclear. Our lab has isolated two bHLH transcription factors-TAPETUM DEGENERATION RETARDATION (TDR) and ETERNAL TAPETUM 1 (EAT1), which are specifically expressed in rice anthers and contribute to sporopollenin formation and tapetum degradation respectively. EAT1 acts down-stream of TDR and can interact with TDR. We implemented electron microscope analysis and found the ubisch bodies and pollen exine of eat1 were abnormal. Transcriptome analysis revealed a total of 1192 genes were differentially expressed between wild-type and *eat1* anthers, including a large set of genes predicted to be related to lipid metabolism and transport. Dual-luciferase reporter assay carried in tobacco leaves shown that TDR and EAT1 can separately or cooperatively regulate LTPL64, LTPL68/OsC6 and other down-stream genes which are involved in pollen exine morphogenesis. The phenotypic analysis of LTPL64-RNAi lines exhibited its ubisch bodies are abnormal and baculum of pollen exine is missing, which are similar to that of *eat1*. This study preliminarily demonstrates the EAT1 and TDR can form different dimer patterns to more meticulously regulates LTPL64, LTPL68/OsC6 and other lipid metabolic genes to affect pollen wall development and it is of significant importance in the basic research area to better understand the molecular mechanisms of pollen exine development.

Key words: Rice, Pollen Exine Development, TDR, EAT1, Gene Regulation



目 录

第一章	绪论	1
1.1	引言	1
1.2	花粉壁的结构与花粉外壁的形成过程	1
	1.2.1花粉壁的结构	1
	1.2.2花粉外壁的形成过程	2
1.3	绒毡层脂类代谢与转运相关基因参与花粉外壁发育	2
1.4	水稻雄性不育基因 TDR 与 EAT1 的研究进展	3
	1.4.1 TDR 调控绒毡层细胞 PCD 和花粉外壁发育	3
	1.4.2 EAT1 作为 TDR 下游调控绒毡层细胞 PCD	3
1.5	本课题研究的目的、内容和意义	4
第二章	实验器材	5
2.1	实验材料	5
2.2	菌株	5
2.3	质粒载体	5
2.4	常用试剂与服务	5
第三章	实验方法	7
3.1	水稻 gDNA CTAB 提取法	7
3.2	聚合酶链式反应(PCR)	7
3.3	水稻组织 RNA Trizol 提取法	8
3.4	SYBR Green 实时定量反转录 PCR(qRT-PCR)	9
3.5	载体构建1	0
3.6	质粒提取1	0
3.7	水稻组织培养与转化1	1
3.8	扫描电子显微镜样品制作方法1	1
3.9	透射电子显微镜样品制作方法1	1
	3.9.1 材料固定1	1
	3.9.2样品制作1	2
3.10	0 原位杂交1	2
	3.10.1 植物材料的固定、包埋和制片1	2
	3.10.1.1植物材料的固定和包埋1	2
	3.10.1.2切片和展片1	2
	3.10.2 RNA 探针的地高辛标记1	2
	3.10.2.1克隆转录模板1	2
	3.10.2.2RNA 探针的标记1	2
	3.10.2.3RNA 探针的检测1	3
	3.10.3 原位杂交1	3
	3.10.3.1组织预处理1	3
	3.10.3.2杂交1	3



3.10.3.3冲洗14
3.10.3.4抗体染色14
3.11 染色质免疫沉淀14
3.12 凝胶阻滞实验15
3.12.1 DIG 标记 EMSA 探针15
3.12.2 探针灵敏度的检测15
3.12.3 凝胶阻滞实验15
3.12.4 转膜与显色16
3.13 基因芯片分析16
3.14 双荧光素酶报告实验16
第四章 实验结果与讨论17
4.1 eat1 突变体花粉外壁发育异常17
4.1.1 脂类物质在 eat1 突变体绒毡层异常积累
4.1.2 eat1突变体乌氏体发育异常17
4.1.3 eat1 突变体花粉外壁发育异常17
4.2 eat1 花药转录组分析显示 EAT1 影响脂类代谢相关基因的表达
4.3 LTPL64 通过影响脂类物质运输参与乌氏体和水稻花粉外壁发育22
4.4 tdr与 eat1 转录组芯片数据比较分析25
4.5 双荧光素酶报告实验显示 TDR 和 EAT1 单独或共同调控下游靶标基因的表达27
4.6 讨论: TIP2、TDR、EAT1 三者的调控关系与下游基因的功能28
第五章 总结与展望31
5.1 EAT1 和 TDR 通过共同调控脂类代谢和运输相关基因,参与水稻乌氏体和花粉外壁
的发育过程31
5.2 后续工作展望32
参考文献33
谢辞37
附录38



# 第一章 绪论

### 1.1 引言

杂种优势广泛存在于生物界,现代农业科学最重要的成就之一就是利用各类作物的杂种 优势来提高其产量和品质,并且为保障我国乃至世界的粮食和油料安全供给发挥了不可替代 的作用。在过去的近 80 年里,杂交育种技术的应用使作物的产量大幅度提高,尤其在玉米、 水稻、高粱、油菜等重要农作物上取得了巨大的社会效益和经济效益。而雄性不育是杂种优 势利用的主要途径之一,在植物杂种优势利用方面起到至关重要的作用,其相关分子机理的 进一步深化研究,也必将对于杂种优势的深入利用提供更好的指导和促进作用。雄性不育主 要是指植物花药或花粉不能正常发育的现象。而影响花药或花粉发育过程的因素很多,其中, 花粉壁的形成和发育异常是目前造成雄性不育的最主要原因。水稻作为世界上三分之一人口 的主食,在农业生产中有着重要作用。因此对水稻生殖发育的研究(尤其是雄性不育的机理 研究)对水稻的杂交和增产有着重要意义。

花粉作为种子植物的小孢子,成为雄性不育研究中的主要对象。被子植物的成熟花粉中 通常含有两个或三个细胞,其中一个为营养细胞,另一个为生殖细胞或由生殖细胞分裂后产 生的两个精子。各类植物的花粉各不相同。人们根据花粉的形状、大小、萌发孔数目和结构、 对称性、花粉壁的结构以及表面雕纹等特性,可以将花粉鉴定到科和属,甚至是种。花粉大 多为球形,我们将赤道轴比极轴长的称为扁球形;特别扁的称为超扁球形;相反则称为长球 形,特别长的称为超长球形。花粉在极面的赤道轮廓,可以呈圆形,或具角状、裂片状等等。 在赤道面观,花粉轮廓可呈圆形、椭圆形、菱形、方形等等。花粉粒的大小因种而不同,变 化很大。最小的花粉直径为6 µm 左右,而风媒花的花粉直径可达 90—100 µm<sup>[1]</sup>。花粉多具 有萌发孔,萌发孔为花粉壁上变薄的区域,花粉萌发时花粉管往往由萌发孔伸出。萌发孔按 其长和宽的比例,通常分为沟和孔两类。简单萌发孔通常只具有沟或孔,而复合萌发孔则同 时由沟和孔组成。萌发孔分布在极面,赤道面或散布于球面。分布于远极面上的单沟,又称 为槽。

## 1.2 花粉壁的结构与花粉外壁的形成过程

花粉壁是包裹在花粉外具有多层结构的特殊细胞壁,主要由脂类物质组成的孢粉素和多 糖物质组成的纤维素共同构成,其物理化学特性非常稳定。由于其稳定的理化性质,花粉壁 在小孢子的发育过程中维持着细胞膜的稳定<sup>[2,3]</sup>,保证成熟花粉在脱离母体后仍能保持水分, 并维持其正常的生殖活性,抵御包括物理、化学和生物因素在内的各种侵扰。除此之外,花 粉壁还与授粉时柱头与花粉的识别过程息息相关<sup>[4,5]</sup>。

1.2.1 花粉壁的结构

花粉壁的结构远比一般的植物细胞细胞壁复杂。虽然花粉壁的形态在不同物种之间具有 一定差异,但其结构较为一致,通常都由内壁(Intine)、外壁(Exine)和含油层(Tryphine) 三层组成<sup>[6,7]</sup>,其中外壁又分为两层:具有蜂窝状结构的外壁外层(Sexine)和相对平坦的 外壁内层(Nexine)。外壁外层由柱状层(Baculum)和顶盖层(Tectum)构成(图1-1)。外 壁内层则主要作为花粉外壁形成的骨架。由于花粉外壁稳定性极强、溶解性极难,因此我们 对其生化本质依然知之甚少。目前已知花粉外壁的主要成分是绒毡层细胞合成并分泌的孢粉 素。孢粉素是一种主要由多羟基脂肪族化合物、酚类和酮类等物质构成的多聚物,通过沉积



在小孢子表面后形成高度复杂的网状结构。花粉壁内壁的成分相对简单,主要由纤维素、蛋白质和果胶构成<sup>[8]</sup>。花粉外壁外通常还覆盖着一层脂质层,称为含油层,它对花粉识别受精信号、保证花粉附着在柱头或昆虫上起着关键作用<sup>[9]</sup>。



图 1-1. 花粉壁结构图 Fig 1-1 Scheme of pollen wall

Intine: 内壁 Exine: 外壁

Sexine: 外壁外层 Nexine: 外壁内层 Baculum: 柱状层 Tectum: 覆盖层

#### 1.2.2 花粉外壁的形成过程

2004 年, Scott 和 Blackmore 等人根据花粉外壁在不同时期的发育情况,归纳总结了开花植物花粉外壁的发育过程<sup>[4,10]</sup>,主要包括:

(1) 胼胝质壁是小孢子外壁沉积的第一层物质,是初生外壁的模板,胼胝质合成起始 于小孢子母细胞期,在减数分裂时期,胼胝质壁开始增厚,到四分体时期,四分体被厚厚的 胼胝质所包裹。拟南芥中的 CalS5<sup>[11]</sup>、GLUCAN SYNTHASE-LIKE 1 和 12 (GSL1 和 GSL12) <sup>[12]</sup>以及水稻中的 GSL5<sup>[13]</sup>均在小孢子发育过程中参与胼胝质壁的形成过程,其突变体均呈现 出胼胝质合成受阻,花粉外壁形态发育异常<sup>[11-13]</sup>;

(2) 胼胝质壁形成后,初生外壁开始发育,初生外壁主要由多糖类物质组成,作为外壁发育模板引导孢粉素沉积。DEX1作为一个膜上钙离子结合蛋白被认为参与初生外壁的形成过程,其突变体的初生外壁显著减少,花粉外壁发育异常<sup>[14]</sup>。初生外壁合成的第二期,花粉壁上的柱状结构开始特化。柱状结构在其表面接受孢粉素前物质使其更牢固。NO EXINE FORMATION 1 (NEF1)、RUPTURED POLLEN GRAIN 1 (RPG1)、NO PRIMEXINE AND PLASMA MEMBRANE UNDULATION (NPU)和 Exine Formation Defect (EFD)被认为在拟南芥中参与柱状结构的发育过程<sup>[2, 15-17]</sup>;

(3)初生外壁合成的最后期,模版开始消失并开始形成牢固的外壁内层1(Nexine 1), 胼胝质壁被小孢子合成的β-1,3-葡聚糖酶(β-1,3-glucanases)溶解(A6 在拟南芥、油菜和水 稻中均参与此过程<sup>[18, 19]</sup>),花粉外壁通过绒毡层分泌的孢粉素进一步加固,之后外壁内层2 (Nexine 2)开始合成;

(4) 在花粉外壁发育完成后,花粉的内含物开始增多,疏水性脂类、蛋白质等开始填充至外壁的缝隙,并逐渐发育成为含油层。含油层的形成过程目前还不是很明确,但 ECERIFERUM (CER) 基因(包括 CER1<sup>[20]</sup>, CER3/FLP1<sup>[21]</sup>和三个 CER2-LIKE 基因<sup>[22]</sup>)以及 Long-Chain Acyl-CoA Synthetases (LACS)1和4<sup>[23]</sup>等基因突变体的含油层均出现异常。

在花粉外壁的形成过程中,有成千上万个基因参与和维持这个过程,理论上任何关键基因的缺失或功能改变,都会造成花粉外壁不能正常形成。

# 1.3 绒毡层脂类代谢与转运相关基因参与花粉外壁发育

除了小孢子自身表达的部分基因参与花粉外壁的形成过程,另一个决定花粉外壁能否正常形成的关键因素是绒毡层细胞。绒毡层(tapetum)是开花植物孢子囊最内侧的细胞层, 在种子植物中存在于幼花药的内侧,最靠近小孢子(图 1-2)。绒毡层内脂类物质的代谢和运输对于花粉外壁的发育起着关键的作用<sup>[24]</sup>:

(1) 绒毡层细胞内脂类物质的正常代谢是孢粉素正常形成的前体条件。孢粉素主要由 多羟基脂肪族化合物、酚类和酮类等脂类物质或衍生物构成,同时孢粉素的形成场所为绒毡



层细胞。绒毡层细胞分泌孢粉素前体,这些前体物质在初生外壁上聚合积累,逐渐形成花粉 外壁<sup>[25]</sup>。因此绒毡层内与脂类代谢相关的基因能否发挥正常功能与花粉外壁能否正常发育 息息相关。脂类物质的合成通路非常复杂,以脂肪酸合成为例,从合成乙酰辅酶 A 开始, 需要乙酰辅酶 A 羧化酶、羧酸合成酶、脂肪酸合成酶等多种酶类的共同作用,需要内质网、 线粒体、叶绿体等细胞器的相互协作,同时还需要 ATP、NADPH 等小分子的参与。而目前 在拟南芥、水稻等模式植物绒毡层细胞中已经确定了大量基因与脂类代谢通路相关。*MALE STERILITY2*(*MS2*)<sup>[26]</sup>和 *DEFECTIVE POLLEN WALL*(*DPW*)<sup>[27]</sup>分别在拟南芥和水稻中参 与到脂肪酸的还原反应中。而水稻中的 *CYP704B2*<sup>[28]</sup>和 *CYP703A3*<sup>[29]</sup>等基因的功能缺失也会 造成孢粉素的合成异常,并且同源基因在拟南芥中也出现相似表型<sup>[26, 30, 31]</sup>。除此之外, fatty-acyl-CoA synthetase(ACOS5)<sup>[32]</sup>、polyketide synthase(PKSA 和 PKSB)<sup>[33, 34]</sup>、tetraketide reductase(TKPR1 和 TKPR2)<sup>[35]</sup>和 CYP704B 等蛋白可以在内质网内形成孢粉素代谢区室 来更加有效的合成孢粉素前体物质<sup>[36]</sup>;

(2) 脂类物质的正确运输是花粉外壁正常形成的重要保障。在绒毡层表达的 ATP-Binding Cassette (ABC)、Lipid Transfer Protein (LTP)和 Multidrug And Toxic Efflux (MATE)家族基因被认为参与到对脂类前体物质的运输过程<sup>[37]</sup>。水稻中的 *OsABCG15/PDA1*<sup>[38]</sup>和其在拟南芥中的同源基因 *AtABCG26*<sup>[39, 40]</sup>参与到脂类前体物质和酮类 物质的运输。AtABCG9和 AtABCG31 在拟南芥绒毡层细胞中参与运输甾醇类物质<sup>[41]</sup>。而拟 南芥中 Magnesium Transporters (AtMGT4、AtMGT5和 AtMGT9)等转运蛋白也被认为与 小孢子的发育密切相关<sup>[42]</sup>。

因此, 绒毡层细胞内脂类代谢和转运相关基因的正确表达与否, 对于花粉外壁的正常发 育起到至关重要的作用, 并进一步影响花粉的可育性。

# 1.4 水稻雄性不育基因 TDR 与 EAT1 的研究进展

1.4.1 TDR 调控绒毡层细胞 PCD 和花粉外壁发育

TDR(Tapetum Degeneration Retardation)编码一个 bHLH(basic Helix-Loop-Helix)转录因子,其突变体主要突变表型为绒毡层异常膨大,降解不能正常进行,绒毡层内表面乌氏体消失,花粉外壁和花药外壁的形成受到影响,最终因花粉发育不正常导致完全雄性不育。 TDR 在绒毡层和花粉发育过程中起着十分重要的作用,它是控制绒毡层发生细胞程序性死亡(Program Cell Death, PCD)的正调控因子;同时,在花粉发育过程中,其通过直接调控*OsC6、CYP104B2、CYP703A3*等下游基因,在脂类物质代谢和花粉外壁形成过程中起着重要的作用<sup>[43]</sup>。

1.4.2 EAT1 作为 TDR 下游调控绒毡层细胞 PCD

我们前期的工作已经分离鉴定出一株水稻雄性不育突变体 Eternal Tapetum 1(EAT1), Niu Ningning 等在 2013 年已证明其作为 TDR 下游的一个 basic Helix-Loop-Helix 转录因子通 过直接调控天冬氨酸蛋白酶 OsAP25 和 OsAP37 的表达参与到水稻绒毡层细胞的程序性死亡 (PCD),并影响水稻花粉小孢子的发育造成水稻雄性不育<sup>[44]</sup>。EAT1 除了参与绒毡层细胞 程序性死亡外,可能还具有其它生物学功能。





图 1-2 水稻花药横切结构图(修改自 Suwabe et al., 2008<sup>[45]</sup>) Fig 1-2. Scheme of a cross-section of a rice anther containing immature microspores E:表皮(Epidermis) En:药室内壁(Endothecium)

ML: 中间层(Middle Layer) T: 绒毡层(Tapetum) M: 小孢子(Microspore)

# 1.5 本课题研究的目的、内容和意义

在水稻 eatl 突变体中,我们发现该基因缺失会导致花粉外壁发育异常、柱状层减少、 乌氏体异常、绒毡层中脂类物质过量积累。同时,通过芯片表达谱数据分析,我们发现该突 变体在花药发育过程中,有很多脂类代谢相关基因的表达量出现下降。本毕业设计在前期研 究的基础上,进一步通过综合利用遗传学、细胞生物学、分子生物学、生物化学、生物信息 学等技术手段,来探讨绒毡层中关键 bHLH 转录因子 EAT1 和 TDR 它们是如何单独以及相 互作用,通过调控脂转运蛋白类基因家族(Lipid Transfer Proteins, LTPs)等脂类代谢和运 输相关基因来影响花粉壁形成的,从而进一步了解花粉外壁发育的过程。本研究工作为水稻 生殖发育分子机制的研究提供了重要线索,更为水稻的育种和增产提供了宝贵的理论依据和 科学数据。



# 第二章 实验器材

## 2.1 实验材料

野生型水稻: 粳稻品种 9522

突变体水稻: 粳稻背景 tdr, eatl 来源于实验室水稻粳稻突变体库,为<sup>60</sup>Co射线诱变后分离所得<sup>[46]</sup>。

烟草野生型: Nicotiana benthamiana

#### 2.2 菌株

司

司

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α和BL21、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV1301 和 EH105 均来自于实验室保存。

## 2.3 质粒载体

Dual-Luciferase reporter assay 载体 pGreenII-0000 为新加坡国立大学俞皓博士惠赠; pGreenII-0800 为杨洪全教授惠赠; 克隆载体 pMD18-T、pEasy-Blunt 和 RNAi 载体 pTCK303 来源于本实验室保存。

# 2.4 常用试剂与服务

GXL DNA 聚合酶	TaKaRa 公司
rTaq DNA 聚合酶	TaKaRa 公司
2X Taq PCR master mix	DBI-Bioscience 公
-	
DNA 分子量标准(2K/2Kplus)	TaKaRa 公司
琼脂糖	BIOWEST 公司
T4 DNA 连接酶	Thermo公司
卡那霉素	上海,先锋药业
氨苄青霉素	上海,先锋药业
利福平	上海,先锋药业
潮霉素	上海,先锋药业
特美汀	上海,先锋药业
限制性内切酶	New England Biolabs 公司
质粒小提试剂盒	Omega公司
反转录试剂盒	TaKaRa 公
胶回收试剂盒	Omega公司
Trizol reagent	Invitrogen 公司
原位杂交 RNA 探针标记试剂盒	Roche 公司
Dual-Luciferase reporter assay Kit	Promega 公司
SYBR Green 实时定量 PCR 试剂	Bio-Rad 公司
酵母提取物	Oxoid公司
胰蛋白胨	Oxoid公司
牛肉膏	
琼脂粉	



	乙酰丁香酮	生工生物工程公司
	吗啉乙磺酸	生工生物工程公司
	蔗糖	生工生物工程公司
	葡萄糖	生工生物工程公司
	肌醇	生工生物工程公司
	甘氨酸	生物工程公司
	4 Xiix 盐酸硫胺素	生工生物工程公司
	血改动为来	出工生物工程公司
	血敗心少日	···
	四段	····
	イ	
	大冬氨酸	
	精氨酸	
	激动素	生丄生物丄桯公司
	十略素	生工生物工桯公司
	山梨醇	生工生物工程公司
	水解酪蛋白	生工生物工程公司
	脯氨酸	生工生物工程公司
	谷氨酸	生工生物工程公司
	盐酸	生工生物工程公司
	异丙醇	生工生物工程公司
	氯仿	生工生物工程公司
	7.醇	生物工程公司
	Phytagel	BIOWEST 公
긝	T nyuger	DIOWLDI Z
ΗĴ	KNO	<b>止</b> 工 止 枷 工 钽 八
⊒⊺	KINO <sub>3</sub>	王王王彻上祖公
ъĵ		<b>止</b> 工 止 枷 工 印 八
_	NH4NO <sub>3</sub>	
可		
	$CaCl_2 2H_2O$	生丄生物丄桯公司
	NaCl	生工生物工程公
司		
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	生工生物工程公司
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	生工生物工程公
司		
	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	生工生物工程公司
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	生工生物工程公司
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	生工生物工程公
司	5 - 5	
	КІ	生工生物工程公
큵		
ΗĴ		开工生物工程公司
	$Na_2MI0O_4 \ 2\Pi_2O$	生工生物工性公司
_	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	
ЪÌ		
_	$CoCl_2 6H_2O$	生土 生物 上 程 公
可		
	6-BA	生工生物工程公司
	NAA	生工生物工程公司
	Na <sub>2</sub> -EDTA	生工生物工程公
司		
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	生工生物工程公司



<b>Fr</b> is	司
DNA 测序	尼
日物会成	卍
	川川
基因芯片检测Gene Tech Biotechnology 公	司



# 第三章 实验方法

# 3.1 水稻 gDNA CTAB 提取法

该方法步骤基于 Murray et al. 1980<sup>[47]</sup>并加以修改。

(1) 取适量水稻叶片(已干燥)于2ml 离心管中,加入三粒钢珠,置于高速球磨仪破碎5min;

(2) 瞬离,加入 650 µl 1.5X CTAB,振荡,混匀后放入 65 ℃ 水浴 20 min,每 5 min 颠 倒一次;

(3) 加入 650 µl 氯仿, 振荡, 13000 rpm, 10 min;

(4) 吸取上清至 1.5 ml 离心管中,加入等体积异丙醇,混匀,-20℃,1 h;

(5) 13000 rpm, 10 min, 弃上清;

(6) 加入1ml70%乙醇洗涤沉淀两次;

(7) 晾干,加入 50 µl ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀,-20 ℃ 保存。

# 3.2 聚合酶链式反应 (PCR)

所使用引物,详见附录表 S-1。

(1) GXL DNA 聚合酶 PCR 反应体系与反应条件:

表 3-1 GXL DNA 聚合酶 PCR 反应体系			
Table 3-1 The PCR Reaction System of GXL DNA Polymerase			
试剂	使用量		
5X GXL buffer	10 µl		
2.5mM dNTP	4 µl		
Primer F $(10 \text{ mM})$	1.5 μl		
Primer R $(10 \text{ mM})$	1.5 µl		
50%甘油	2.5 μl(目的片段高 GC 含量)		
GXL DNA 聚合酶	1 µl		
模板 DNA	100 µg		
ddH <sub>2</sub> O	补足 50 山		

#### 表 3-2 GXL DNA 聚合酶 PCR 反应条件 Table 3-2 The PCR Program of GXL DNA Polymerase

、釵
Х

(2) 2X Taq PCR master mix PCR 反应体系与反应条件:

#### 表 3-3 2X Taq PCR master mix PCR 反应体系 Table 3-3 The PCR Reaction System of 2X Taq PCR master mix



试剂	使用量	
2X Taq PCR master mix	10 µl	
Primer F (10 mM)	0.5 µl	
Primer R (10 mM)	0.5 µl	
模板 DNA	100 µg	
ddH <sub>2</sub> O	补足 20 ul	

#### 表 3-4 2X Taq PCR master mix PCR 反应条件 Table 3-4 The PCR Program of 2X Tag PCR master mix

Table 5-4 The FCK Flogram of 2A Tay FCK master mix			
步骤	温度	时间	循环数
预变性	94 °C	5 min	
变性	94 °C	10 s	
退火	55~65 °C	20 s	35X
延伸	72 °C	1 kb/min	
总延伸	72 °C	7 min	
冷却	4 °C	5 min	

(3) rTaq DNA 聚合酶 PCR 反应体系与反应条件:

表 3-5 rTaq DNA 聚合酶 PCR 反应体系			
Table 3-5 The PCR Reaction System of rTaq DNA Polymerase			
试剂	使用量		
10X Taq buffer	2 µl		
2.5mM dNTP	2 µl		
Primer F (10 mM)	0.5 µl		
Primer R $(10 \text{ mM})$	0.5 µl		
rTaq DNA 聚合酶	0.4 µl		
模板 DNA	100 µg		
ddH <sub>2</sub> O	补足 20 µl		

#### 表 3-6 rTaq DNA 聚合酶 PCR 反应条件 Table 3-6 The PCR Program of rTag DNA Polymerase

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94 °C	5 min	
变性	94 °C	10 s	
退火	55~65 ℃	20 s	35X
延伸	72 °C	1 kb/min	
总延伸	72 °C	7 min	
冷却	4 °C	5 min	

# 3.3 水稻组织 RNA Trizol 提取法

Trizol 法基于 Verwoerd et al., 1989<sup>[48]</sup>并加以修改。 所有试剂必须使用 DEPC-ddH<sub>2</sub>O 配置,离心管必须为 RNase free!

- (1) 取适量水稻小花于 2 ml 离心管,加入三粒钢珠,液氮速冻,球磨仪破碎 5 min;
- (2) 加入 800 µl Trizol, 振荡;
- (3) 加入 200 µl 氯仿, 剧烈震荡混匀;
- (4) 4℃离心, 12000 rpm, 5 min;
- (5)将上清转入 1.5 ml 离心管中,加入等体积的异丙醇,混匀,-20 ℃ 放置 1 h;
- (6)转入 RNA 回收柱, 离心, 12000 rpm, 1 min, 弃滤液;



(7)加入700 µl 70%乙醇,4℃离心,12000 rpm,1 min,弃滤液;

(8) 4 C 离心, 12000 rpm, 2 min;

(9) 加入 30 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O 洗脱, -80 ℃ 保持。

# 3.4 SYBR Green 实时定量反转录 PCR (qRT-PCR)

反转录: 参见 TaKaRa PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 操作手册。 (1) 去除基因组 DNA 反应:

表 3-7 反转录去除基因组 DNA 反应体系

Table 3-7 The System of Genomic	DNA Elimination Reaction
试剂	使用量
5X gDNA Eraser Buffer	4 µl
gDNA Eraser	2 µl
Total RNA	3 µg
RNase Free dH <sub>2</sub> O	补足 20 µl
42 °C	2 min

(2) 反转录反应:

表 3-8 反转录反应体系		
Table 3-8 The System of Reverse-transcription Reaction		
	试剂	使用量
	步骤(1)的反应液	20 µl
	PrimeScript RT Enzyme Mix I	2 µl
	RT Primer Mix	2 µl
	5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	8 µl
	RNase Free dH <sub>2</sub> O 8 $\mu$ l	

37 °C

85 °C

12 min

5 s

主 2 0 后灶马后应休死

实时定量 PCR 反应体系与反应条件:

以 OsActin 作为内参,所使用引物,详见附录表 S-1。

表 3-9 SYBR Green 定量 PCR 反应体系

Table 3-9 The Reaction System of SYBR Green qRT-PCR		
试剂	使用量	
2X iQ SYBR Green Supermix	10 µl	
Primer F $(10 \text{ mM})$	0.5 µl	
Primer R $(10 \text{ mM})$	0.5 µl	
模板 cDNA	1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	8 µl	

#### 表 3-10 SYBR Green 定量 PCR 反应条件 Table 3-10 The Program of SYBR Green gRT-PCR

Table 3-10 The Program of STBR Green QRT-PCR				
步骤	温度	时间	循环数	
预变性	95 °C	5 min		
变性	95 °C	10 s		
退火	60 °C	15 s	45X	
延伸	72 °C	20 s		
	95 °C	10 s		
溶解曲线	65 °C	5 s		
	95 °C	0.5 °C/s		



#### 3.5 载体构建

构建载体所使用引物,详见附录表 S-1。

(1) 根据载体图谱和目的片段,选择适当酶切位点,设计扩增引物;

(2)使用引物进行 PCR 扩增,凝胶电泳,回收对应条带(胶回收步骤按照 OMEGA E.Z.N.A Gel Extraction Kit 操作手册进行);

- (3) 将回收片段连接至 pEasy-blunt 克隆载体;
- (4) 连接产物大肠杆菌 DH5α 感受态细胞热击转化;
- (5) 菌落 PCR 鉴定,选择正确菌液样品送测序;
- (6) 提取测序正确样品质粒;
- (7) 对目的载体和片段进行酶切:

太5-H 两切及应冲水		
Table 3-11 The System of Digestion Reaction		
试剂	使用量	
10X CutSmart Buffer	5 µl	
限制性内切酶 1-HF	1 µl	
限制性内切酶 2-HF	1 µl	
目的载体/目的片段	2 µg/43 µl	
ddH <sub>2</sub> O	补足 50 μl	
37.9	7 / h	

表 3-11 酶切反应休系

(8) 对载体和片段进行胶回收(胶回收步骤按照 OMEGA E.Z.N.A Gel Extraction Kit 操作手册进行);

(9) T4 连接酶连接载体与片段:

表 3-12 T4 连接酶反应体系		
Table 3-11 The System of T4 Ligase Reaction		
试剂	使用量	
10X T4 Ligase Buffer	2 µl	
载体	20 ng	
插入片段	100~200 ng	
T4 Ligase	1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	补足 20 µl	
22	℃ 1 h	

(10) 连接产物大肠杆菌 DH5α 感受态细胞热击转化;

(11) 菌落 PCR 鉴定,选择正确菌液样品送测序;

(12)提取测序正确样品质粒。

# 3.6 质粒提取

方法步骤基于 Sambrook et al., 2001<sup>[49]</sup>的方法并做稍许修改,具体参见 OMEGA E.Z.N.A Plasmid mini Kit I 操作手册。

(1) 挑取单克隆至含有对应抗生素的 LB 培养基中培养, 37 °C, 220 rpm, 16 h;

(2) 使用 2 ml 离心管离心收集菌体, 13000 rpm, 1 min, 室温;

(3) 使用 250 µl 已加入 RNase 的 Solution I 重悬菌体;

(4) 加入 250 µl Solution II, 颠倒两次, 静置 2 min;

(5) 加入 350 µl Solution III, 颠倒数次直至出现白色絮状沉淀;

(6) 离心, 13000 rpm, 10 min, 室温;

(7) 将上清转入至 HiBind miniprep Column I 中, 离心, 15000 rpm, 1 min, 室温;

(8) 弃掉滤液,加入 500 µl Buffer HB 洗涤离心柱,离心,10000 rpm,1 min,室温;

(9)弃掉滤液,加入 700 µl 已使用乙醇稀释的 Washing Buffer 洗涤离心柱,离心,10000



rpm, 1 min, 室温;

(10) 弃掉滤液,离心,13000 rpm, 2 min,室温;

(11) 将离心柱转入新的 1.5 ml 离心管中, 加入 50 μl ddH<sub>2</sub>O, 离心, 13000 rpm, 2 min, 室温洗脱。

# 3.7 水稻组织培养与转化

构建载体所使用引物,详见附录表 S-1。

(1) 材料的预处理

a. 将干种子去壳;

b. 将去壳种子在 70%-75%乙醇中浸泡 1 min;

c. 将去壳种子在 33%次氯酸钠中(加一滴吐温 80) 灭菌 15 min, 倒去废液;

d. 无菌水洗 10 次, 无菌纱布吸干水分;

e. 将整个种子转移至 NBD2(2,4D 浓度 2 mg/L) 培养基平板, 26 ℃ 暗培养 8-10 天;

f. 当黄色愈伤组织在胚轴出现时,切除根部和胚乳,将胚轴转移至一个新鲜的 NBD2 培养基,培养 10 天后转化。

(2)挑取 EHA105 农杆菌单菌落,在 100 ml 加卡那霉素的 YEB 培养基中震荡培养约 16 h, 200rpm, 28 ℃,至 OD600 为 0.6-0.8;

(3) 3000 rpm 离心 10 min,在 AAM-AS (AS 浓度 200 µM)液体培养基中重悬沉淀至 浓度 OD600 为 0.6-0.8;

(4) 将黄色愈伤浸泡在细菌悬液中 5 min, 略微摇晃;

(5) 从悬液中收集胚,在两张无菌吸水纸上吸干;

(6)在 NBD2-AS (AS 浓度为 100 µM)培养基平板表面放上 2 张无菌滤纸,把黄色愈伤放在滤纸表面, 26 ℃ 暗培养 3 天;

(7)把黄色愈伤放入 NBD2 培养基平板上,培养基中事先加入潮霉素 50 μg/ml,特美 汀 400 μg/ml, 26 ℃ 暗培养 12 天;

(8) 再转入新鲜的 NBD2 培养基平板上,培养基中事先加入潮霉 50 µg/ml,特美汀 400 µg/ml, 26 ℃ 暗培养 12 天,在这个时间可以看见新的愈伤长出;

(9)把抗性愈伤放在预分化培养基(Pre-MS)平板上, 26℃暗培养 6-8 天;

(10)把愈伤放在分化培养基 MS-H 培养基平板上,加潮霉素 25 µg/ml,特美汀 200 µg/ml 26 ℃ (24 小时光照)培养,当绿芽出现(大约 15 天),立即将它们转入新鲜的 MS-H 培养 基平板上,加潮霉素 25 µg/ml,新的无根苗在 10 天内形成:

(11) 将无根苗移入再生培养基 MSNH 上,诱导根的形成;

(12) 当根形成后,把苗移入温室。

#### 3.8 扫描电子显微镜样品制作方法

(1) 材料固定: FAA 固定液固定样品, 2小时以上;

(2) 材料脱水: 70%, 80%, 95%, 100%乙醇梯度脱水, 每级 5 min-2 h;

(3) 临界点干燥;

(4) 上铜台:将样品用导电胶固定于铜台上,并将样品调整至适于观察的位置;

(5) 样品喷金;

(6) 扫描电镜观察。

#### 3.9 透射电子显微镜样品制作方法

3.9.1 材料固定

使用 2.5%戊二醛固定液真空固定新鲜材料,更换新鲜固定液置于 4℃ 层析柜内摇床上 过夜;



3.9.2 样品制作

(1)快速完全吸去戊二醛固定液,常温下加2ml0.1MPB缓冲液漂洗3次,每次置于 摇床振荡 30-45 min;

(2) 换适量 0.8% 锇酸, 没过材料, 置于摇床轻轻震荡, 常温避光过夜;

(3)用吸管小心尽量完全吸去锇酸溶液,常温下加2ml0.1MPB缓冲液漂洗3-4次,每次置于摇床振荡15min;

(4) 按以下顺序于摇床上对材料进行梯度脱水: 20%乙醇, 20-30 min; 40%乙醇, 20-30 min; 60%乙醇, 20-30 min; 70%乙醇, 20-30min; 90%乙醇, 20-30min; 100%乙醇, 2-3 次, 每次 15min; 100%乙醇, 10min;

(5)换1ml【无水乙醇:环氧丙烷(2:1)】溶液没过材料,摇床振荡10min;

(6)换1ml【无水乙醇:环氧丙烷(1:1)】溶液没过材料,摇床振荡10min;

(7)换1ml【无水乙醇:环氧丙烷(1:2)】溶液没过材料,摇床振荡10min;

(8)换1ml纯环氧丙烷,没过材料,摇床振荡10min,重复3次;

(9)追加纯树脂2滴,摇床低速振荡2h;

(10)追加纯树脂3滴,摇床低速振荡2h;

(11)追加纯树脂5滴,摇床低速振荡2h;

(12) 吸去 0.5 ml 树脂, 追加纯树脂 0.5 ml, 摇床低速振荡过夜;

(13) 开盖1h, 加纯树脂0.5 ml, 常温低速振荡8h;

(14) 换适量纯树脂没过材料,常温低速振荡过夜;

(15) 换适量纯树脂没过材料, 常温低速振荡 8 h;

(16)将渗透好的材料在模具中进行包埋, 置于 37 ℃ 烘箱 5 h-12 h, 45 ℃ 烘箱 2 h, 65 ℃ 烘箱 48 h。

#### 3.10原位杂交

3.10.1 植物材料的固定、包埋和制片

3.10.1.1 植物材料的固定和包埋:

此过程中应注意避免 RNase 污染。所使用的熔蜡管(管盖高压湿热灭菌)、烧杯、量筒 和药勺均需 180 ℃ 烘 5 小时以上。所用蒸馏水需用 DEPC 处理。所固定的材料越小越好, 尽可能切除多余的材料。切割后应立即固定。取材后若不能立即固定,则应置于冰上运输。

(1) 使用多聚甲醛溶液固定材料;

(2) 按照 0.85% Nacl、50% 乙醇/0.85% Nacl、70% 乙醇/0.85% Nacl 的顺序依次脱水 30 min、5 h、5 h,最后置于 85% 乙醇/0.85% Nacl 过夜;

(3) 按照 95%、100%、100%乙醇的顺序,依次在冰上脱水 5 h;

(4)100%乙醇,室温,2h;50%乙醇/50%二甲苯,室温,1h;100%二甲苯,室温,1h(三次);50%二甲苯/50%石蜡,58℃过夜;

(5)每天换两次100%石蜡(58℃),倾倒时避免产生气泡;

(6)包埋蜡块,包埋好的蜡块放入4℃冰箱中备用。

3.10.1.2 切片和展片:

(1)修块:将包有材料的小蜡块(包含一个材料)初步修成六面体,粘在小木块上。 用刀片将蜡块修成梯形,在材料的周围各留 2mm 的石蜡即可。

(2) 切片: 切片的厚度为 7-10 µm。在解剖镜下用暗视野观察蜡带,决定取舍。

(3)展片:将 DEPC 处理过的蒸馏水滴加在涂有多聚赖氨酸的载玻片上,将蜡带的反面漂浮于其上放入烫板上(42℃)进行展片,吸去多余的水,用一张镜头纸轻轻压在蜡带上,然后用吸水纸吸去多余的水。置于 42 度烫板上干燥过夜。

(4)制好的片子应在一星期内进行杂交。

3.10.2 RNA 探针的地高辛标记

3.10.2.1 克隆转录模板:

设计使用带有 T7 多聚酶的启动子的引物对目标片段进行扩增。

3.10.2.2 RNA 探针的标记:



(1)标记反应体系(kit from Roche):

表 3-13 RNA 探针标记反应体系		
Table 3-13 The Label Reaction System of RNA Probe		
试剂	使用量	
模板 DNA	2 ug	
Transcription buffer	2 µl	
Nucleotides (UTP and dig-UTP mix)	2 µl	
RNASIN (RNase inhibitor)	1 µl	
RNA polymerase	2 µl	
DEPC-H <sub>2</sub> O 补足 20 山		

#### 37℃, 2h;

(2)加入 75 µl 1X MS、2 µl 100 mg/ml 的 tRNA 和 1 µl DNA 酶, 37 ℃, 10 min 终止转 录反应;

(3) 加入 100 µl 3.8M 的 NH4Ac 和 600 µl 预冷的乙醇, -20 ℃, 过夜, 沉淀探针;

(4) 离心, 4℃, 13000-15000 rpm, 10 min, 弃上清;

(5) 用 200 µl 预冷的 70%乙醇/0.15M NaCl 冲洗沉淀;

(6) 离心, 4℃, 13000 rpm, 10 min, 弃上清, 真空干燥;

(7) 沉淀重悬于 50 µl TE (pH7.6) 中, -20 ℃ 保存 (加入 0.5 µl RNase 抑制剂)。

3.10.2.3 RNA 探针的检测:

(1) 取 0.5 µl 的探针和 1-10 ng 的对照 RNA 点膜,自然晾干;

(2) 地高辛缓冲液1浸湿;

(3) 地高辛缓冲液 2 摇 30 min;

(4) 地高辛缓冲液1冲洗;

(5) 地高辛缓冲液 4 摇 30 min;

(6) 地高辛缓冲液 1 冲洗两次, 每次 15 min;

(7) 地高辛缓冲液 5 冲洗;

(8) 地高辛缓冲液 6 显色 10 min 或稍长至信号明显。

3.10.3 原位杂交

此过程中应注意避免 RNase 污染。所使用的盖玻片、烧杯、量筒、切片篮、切片盒和 药勺均需 180 ℃烘 5 小时以上。所用蒸馏水需用 DEPC 处理。枪头和离心管需 RNase free。

3.10.3.1 组织预处理

(1)按以下顺序进行脱蜡处理:二甲苯,10 min;二甲苯,10 min;100%乙醇,1 min;
100%乙醇,30 s;95%乙醇,30 s;85%乙醇,30 s;50%乙醇,30 s;30%乙醇,30 s;0.85%
NaCl,2 min;PBS,2 min;链蛋白酶溶液,10 min;甘氨酸,2 min;PBS,2 min;多聚甲
醛,10 min;PBS,2 min;Co酸酐,10 min;PBS,2 min;0.85%

(2) 按照 30% 乙醇, 50% 乙醇, 85% 乙醇, 95% 乙醇, 100% 乙醇, 100% 乙醇的顺序脱水, 每级 30 秒。

3.10.3.2 杂交

(1) 振荡混合杂交缓冲液,离心,置于室温下;

(2) 将下列试剂在冰上混合: 2 µl 探针、2 µl H<sub>2</sub>O、4 µl 去离子甲酰胺;

(3)将探针/水/甲酰胺混合物在80℃加热2min,离心,在冰上冷却;

(4)将探针混合液(8 µl/张)与杂交缓冲液(32 µl/张)混合,振荡,离心,置于室温下;

(5)将载片篮拿出,吹干载玻片上乙醇;

(6)每一张载玻片加 38~40 µl 的杂交缓冲液/探针溶液,用处理过的盖玻片盖于其上, 避免产生气泡;

(7)将4张吸水纸双折,铺于盒底,加入50ml水,再于纸上盖一层保鲜膜,载玻片置 于其上,盖上盒盖,用胶带密封;

(8)在50℃水浴锅中杂交过夜;



上海交通大学 Shanghai Jiao Tong University

(1)将载玻片放入载片篮并置于冲洗缓冲液中,50℃水浴,30 min;

- (2)更换新鲜冲洗缓冲液 50℃ 水浴,1h 30 min,重复一次;
- (3) 使用 NTE 溶液,在 37 ℃ 水浴中冲洗两次,每次 5 min;
- (4) 载片篮放入 RNA 酶 A 溶液中, 37 ℃ 水浴 30 min;
- (5) 使用 NTE 溶液, 室温冲洗两次, 每次 5 min;
- (6) 使用冲洗缓冲液, 50℃水浴, 1h;
- (7) 使用 1X SSC, 室温冲洗 2 min;
- (8) 使用 PBS, 室温冲洗 5 min;

3.10.3.4 抗体染色

(1)在三维摇床上按照下列顺序进行染色:地高辛缓冲液 1,5 min;地高辛缓冲液 2,1h;地高辛缓冲液 3,30 min;地高辛缓冲液 4,1h 30 min;

- (2) 使用地高辛缓冲液 3 冲洗四次,每次 20 min;
- (3)分别使用地高辛缓冲液1和地高辛缓冲液5冲洗5min;
- (4) 加入地高辛缓冲液 6;

(5)将盒子加盖,密封,置黑暗处显色 36 小时或更长,每隔 12 小时检查显色情况,以避免背景过深;

(6) 按下列顺序终止酶反应,洗去背景:蒸馏水、70%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、 95%乙醇、70%乙醇、蒸馏水,每级5s;

(7) 晾干后封片。

### 3.11染色质免疫沉淀

除特殊注明,所有操作都在4℃进行

- (1) 室温下把材料浸在 37 ml 含 1%的甲醛的 EB1 液中, 抽真空 10 min;
- (2) 加入 2M 甘氨酸使终浓度至 0.125M,中止反应,继续抽真空 5 min;
- (3) 用 40 ml 水洗材料 3-4 遍;
- (4) 去除水分,将材料液氮冷冻;
- (5) 液氮预冷研钵和杵子, 液氮研磨幼苗成粉末状;
- (6) 在 50 ml 管中加入 30 ml EB1 悬浮组织(此时, EB1 中不含甲醛);
- (7) 4 层 miracloth 过滤组织到一个新的 50 ml 管中;
- (8) 4 °C, 2880g 离心 20 min;
- (9)移去上清,使用1mlEB2重悬沉淀并转移至一个新的1.5ml离心管;
- (10) 4 °C, 12000g 离心 10 min;
- (11) 移去上清,使用 300 µl EB3 重悬沉淀;
- (12) 转入另一已加入 300 µl EB3 新管中;
- (13) 4℃, 16000g 离心1小时;

(14) 去上清,使用 300 µl NLB 重悬沉淀,涡旋,用枪头吹打,保留 10 µl 溶液做后续 检测;

- (15) 超声波处理溶液, 打断 DNA 成约 0.5-2 kb 的 DNA 片段;
- (16) 4℃, 16000g 离心 5 min 沉淀碎片;
- (17) 转移上清到一个新管。保留 10 µl 溶液检测超声效率做后续检测;
- (18) 分装 200 µl 到 2 个新管, 每管 100 µl;
- (19) 每管加 900 µl ChIP 稀释液, 使 SDS 浓度变为 0.1%;

(20)每个样品加 4-40 μl 剪切的鲑精 DNA /蛋白 A 琼脂糖珠(使用前,必须洗 3 次,

- 然后重悬于 ChIP 稀释液中),4℃,轻轻晃动1小时;
  - (21) 4℃, 16000g 离心 2 min;
  - (22) 合并 2 管上清, 分装到 3 个 EP 管中;
  - (23)加4ul抗体到其中的2管中,另一管作为阴性对照;
  - (24) 4℃过夜,并轻轻晃动;



(25)加 4-40 µl 剪切的鲑精 DNA/蛋白 A 琼脂糖珠(事先用 ChIP 稀释液洗涤处理),4℃ 轻微晃动 1 小时,收集免疫沉淀;

(26) 4 ℃, 16000g 离心 2 min,取沉淀,每次 1 ml 洗脱液洗沉淀 10 min。洗脱液顺序 如下:低盐洗脱液 1 次、高盐洗脱液 1 次、LiCl 洗脱液 1 次、TE 缓冲液 2 次,最后去除 TE 缓冲液;

(27)加 250 µl 新鲜的洗脱缓冲液到沉淀珠中,以释放和珠结合复合物;

(28) 混匀, 65℃水浴 15 min, 轻微晃动;

(29) 小心将上清转移到新管,重复洗涤珠,合并2次洗液;

(30)加20µl5MNaCl,65℃孵育过夜;

(31)加10µl 0.5M EDTA, 20µl 1M Tris-HCl, pH6.5和1.5µl 14 mg/ml 的蛋白酶 K, 65℃温育1小时;

(32)等体积酚/氯仿抽提 DNA,在有 novagen pellet paint 存在的情况下乙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇洗沉淀;

(33) 用 40-50 µl TE 缓冲液(含 10 µg/ml RNase A) 溶解 DNA;

(34)在25 µl PCR体系中,模板加0.5 µl。模板的变化依赖于免疫沉淀的效果。

#### 3.12凝胶阻滞实验

3.12.1 DIG 标记 EMSA 探针

(1)使用地高辛标记的 dNTP,以 9522 基因组 DNA 为模板扩增目的片段,同时常规 dNTP 扩增竞争片段;

(2)取 2-3 µl 电泳,检测条带是否正确;

(3) 在 20 µl 体系中,加入 2 µl 4M LiCl, 60 µl 100% 预冷的无水乙醇, -80 ℃, 2 小时以上;

- (4) 13000g, 15 min, 4 ℃, 小心移去上清;
- (5) 100 µl 预冷的 70% 乙醇洗一遍;
- (6) 13000g, 15 min, 4 ℃,小心去上清;
- (7) 干燥沉淀,用 20 µl 无菌水溶解,-20 ℃ 保存。

3.12.2 探针灵敏度的检测

- (1)取1µl DIG-标记产物,10倍梯度稀释,直至10-5;
- (2) 取宽 1cm 左右尼龙膜,粗糙面朝上,取 10 倍梯度稀释产物各 1µl 标记物点膜;

(3) 超净台吹干;

- (4) 将尼龙膜置于平皿中,用 5 ml DIG-buffer 1 浸湿;
- (5) 移去 DIG-buffer 1, 置于 5 ml DIG-buffer 2 中 30 min, 轻摇;
- (6) 移去 DIG-buffer 2, 用 5 ml DIG-buffer 1 冲洗;

(7) 置于 5 ml DIG-buffer 1 + 1ul DIG-抗体中 30 min;

- (8) 移去上述溶液,用 5ml DIG-buffer 1 冲洗 2 次,每次 15 min;
- (9) 用 5 ml DIG-buffer 5 稍加冲洗;
- (10) 用 5 ml DIG-buffer 6 显色 10min (根据条带显现速度来决定时间)。

3.12.3 凝胶阻滞实验

- (1) 单克隆接种 3ml, 37 ℃ 试管培养至 OD 约 0.6-0.9;
- (2) 加入 IPTG 至终浓度为 0.5mM, 诱导 3 小时;
- (3) 菌液分装成两个 1.5ml 离心管, 离心 20 秒, 13000 rpm, -80 ℃ 保存沉淀部分;
- (4)待沉淀物冷至-80℃,取出加1mlTE(pH8.0)重悬;
- (5) 放回-80℃, 冷至-80℃;
- (6) 13000 rpm 室温离心 1 min, 弃上清;
- (7) 1 ml TE 洗沉淀一遍,移去上清;
- (8) 向沉淀中加 100µl Buffer A, 震荡, 悬浮沉淀, 在冰上放置 30 min;
- (9) 加入4倍体积的 Buffer B, 充分混匀, 冰上放置 30 min;
- (10) 4 ℃, 13000 rpm 离心 10 min, 上清用于结合反应;



(11) 加入 10 μl Reaction Buffer、8 μl 蛋白提取液和 2 μl DIG-探针,室温放置 20 分钟 进行结合反应,然后跑 3.5% 的 PAGE 胶。

#### 3.12.4 转膜与显色

(1)使用电转法,按照负极-转印垫-滤纸-胶-尼龙膜-滤纸-转印垫-正极的顺序放置,在 4℃ 层析柜中恒流 400mA 转膜 1 小时;

(2) 电泳完后, 取尼龙膜于一干净平皿中, 65℃烘箱烘干;

(3) 按 3.12.2 的方法(探针灵敏度的检测)检测结合情况。

# 3.13基因芯片分析

按照 3.3 的方法(水稻组织 RNA Trizol 提取法)提取野生型和 *eat1* 突变体水稻第 9 期和第 10 期花药总 RNA。基因芯片和分析方法参照 Xu et al., 2010<sup>[50]</sup>,使用的基因芯片为Affymetrix 公司芯片,芯片检测由 Gene Tech Biotechnology 公司完成,芯片数据的收集和统计按 Affymetrix 公司提供的方法进行。所有样品均进行三个生物学重复以保证实验结果的重复性并具有统计学意义。选择表达量变化大于 2 倍,即 log2 > 1 的基因作为分析候选基因。

# 3.14双荧光素酶报告实验

该方法基于 Hellens et al., 2005<sup>[51, 52]</sup>并加以修改。构建载体所使用引物,详见附录表 S-1。

使用 pGreenII-0000 和 pGreenII-0800 载体系统,我们分别构建了 35s pro::EAT1-pGreenII-0000、35s pro::TDR-pGreenII-0000、35s pro::eGFP-pGreenII-0000、Os04g48210 pro::LUC-pGreenII-0800 、LTPL64 pro::LUC-pGreenII-0800 和 OsC6 pro::LUC-pGreenII-0800 六个载体。并与辅助质粒 p19-pSoup 共转入农杆菌 GV3101 中,以内参 35s::REN 为背景值,通过在烟草中瞬时表达 LUC 来确定 EAT1 和 TDR 对这三个基因的调控方式 (eGFP 作为空白对照)。

(1) 挑农杆菌单菌落于 15 ml YEB 培养基中, 28 ℃, 18 h, 220 rpm 培养;

(2) 离心收集菌体, 3000 rpm, 10 min;

(3)使用 MS+2%蔗糖培养基重悬菌体至 OD600=0.6,再缓慢加入 MES 至 10 mM, AS 至 200 μM,室温静置 3 h;

(4) 注射前按照 1:4 比例混合含有 pGreenII-0800 载体菌株和含有 pGreenII-0000 载体 菌株,对照组选用空载体代替;

(5) 注射生长状态良好的烟草叶片,弱光培养48h

(6) 使用 1.5 ml 离心管取管口大小的叶片, 液氮速冻;

(7) 使用手动研磨器将叶片磨碎,加入 100 ml Passitive Lysis Buffer,继续研磨几次;

(8) 10000 rpm 离心 5 s;

(9) 取上清 10 μl 至新的 1.5 ml 离心管中, 加入 40 μl 配置好的 Luciferase buffer, 轻弹 10 次混匀;

(10) 测定 LUC 活性数据;

(11) 再加入 40 µl 配置好的 Stop&Glo buffer,轻弹 10 次混匀;

(12) 测定 REN 活性数据。



# 第四章 实验结果与讨论

2012年,我们实验室 Niu Ningning 等报道了一个在水稻绒毡层细胞中特异表达的 bHLH 类转录因子 Eternal Tapetum 1 (EAT1)。该基因的突变体会导致花药绒毡层细胞程序性死亡 (PCD)延迟,小孢子发育异常;进一步 ChIP 和 EMSA 实验证明 EAT1 可以通过直接调控 天冬氨酸蛋白酶 OsAP25 和 OsAP37 的转录从而影响了绒毡层细胞的程序性死亡过程,并最 终影响水稻花粉小孢子的发育造成水稻雄性不育<sup>[44]</sup>。尽管该文章系统的揭示了 EAT1 参与绒 毡层 PCD 过程的分子机制,但并没有阐述 EAT1 是否还具有其它方面的功能。尤其在该文 章中,已经通过体外酵母双杂交实验证明了 EAT1 和 TDR(Tapetum Degeneration Retardation) 存在相互作用,同时 TDR 是已经报道了参与花粉外壁的外壁形成<sup>[43]</sup>,但 EAT1 是否参加花 粉外壁的形成还不清楚,因此,本研究期望通过综合利用遗传学、细胞生物学、分子生物学、 生物化学、生物信息学等技术手段,来探讨绒毡层中关键 bHLH 转录因子 EAT1 和 TDR 它 们是如何单独以及相互作用,通过调控脂转运蛋白类基因家族(Lipid Transfer Proteins, LTPs) 等脂类代谢和运输相关基因来影响花粉壁形成的,从而进一步了解花粉外壁发育的过程。

### 4.1 eat1突变体花粉外壁发育异常

为了更好的了解 EAT1 在水稻花药发育过程中的功能和作用,我们对 eat1 突变体小孢子 发育过程(Stage 8-Stage 13<sup>[53]</sup>)的花药和花粉进行了更为细致的观察。

4.1.1 脂类物质在 eat1 突变体绒毡层异常积累

正常水稻花药的绒毡层细胞对小孢子发育至关重要,可以通过合成各种糖类、蛋白质和 脂类物质来支撑小孢子完成正常发育所需要的物质和能量。通过透射电镜(TEM)分析我 们发现:在小孢子发育的第10期(Stage 10),野生型花药绒毡层细胞内电子密度分布较为 平均,而 eatl 突变体的绒毡层细胞内出现了大量高密度电子物质(主要为脂类物质)的异 常积累(图 4-1 A、B和E);同时第10期时,野生型花药的绒毡层细胞和中层细胞紧密相 邻,而在 eatl 突变体中,绒毡层细胞和中层细胞之间出现了高密度电子物质异常积累(图 4-1 C和D)。脂类物质的异常积累和运输的方向混乱,暗示 EAT1下游脂类转运蛋白基因极 有可能起到关键作用。

4.1.2 eatl 突变体乌氏体发育异常

乌氏体是分泌型绒毡层细胞上的一种特殊结构(水稻的绒毡层属于分泌型绒毡层),用 于将绒毡层细胞合成的营养物质(以脂类、酚类、醛酮类构成的孢粉素为主)转运至小孢子 表面,从而参与到花粉外壁的发育过程<sup>[53-55]</sup>。鉴于 *eat1* 突变体绒毡层以及绒毡层细胞和中 层细胞之间均出现了脂类物质的异常积累,我们使用扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显 微镜(TEM)对野生型和 *eat1* 突变体的乌氏体进行了观察分析。扫描电镜(SEM)结果显 示,在小孢子发育第 10 期(Stage 10),野生型花药内壁上的乌氏体正常形成,单个乌氏体 粗大且具有明显的棱状结构,乌氏体在花药内壁上排列紧密,而 *eat1* 突变体的乌氏体发育 异常,乌氏体数量明显减少,单个乌氏体弱小且更为圆滑(图 4-1 H和 I)。透射电镜(TEM) 分析结果同样表明,*eat1* 突变体的乌氏体呈圆形,而非野生型的方形,同时 *eat1* 突变体乌 氏体在绒毡层表面的密度也小于野生型(图 4-1 F和 G)。这个分析结果表明,EAT1的缺失 也会导致水稻乌氏体的发育异常。

4.1.3 eat1 突变体花粉外壁发育异常

由于花粉外壁主要由脂类物质构成,而 eatl 突变体的乌氏体和绒毡层均出现与脂类物质代谢或转运相关的异常,因此我们着重观察了野生型和 eatl 突变体的花粉壁结构。通过



扫描电镜(SEM)我们发现在减数分裂时期(Stage 8),野生型小孢子发育正常、饱满,而 eat1突变体小孢子出现塌陷(图 4-1 N 和 O)。为了更进一步的观察水稻小包子的外壁结构, 我们又进行了透射电镜(TEM)分析,结果显示在小孢子发育的第12期(Stage 12),野生 型的花粉外壁可以清晰地分为外壁内层(Nexine)、柱状层(Baculum)和覆盖层(Tectum), 而在 eat1 突变体中,位于外壁内层和覆盖层之间的柱状层结构发生变化,电子密度低的区 域大幅减少甚至消失(图 4-1 J、K、L 和 M)。

综合以上表型分析,我们推测 EAT1 的缺失可能会通过影响脂类物质的正常代谢和转运, 从而影响花粉壁的形成和小孢子的发育。



图4-1 eat1突变体电子显微镜表型分析

#### Fig 4-1 The phenotype analysis of *eat1* by electron microscope

(A)和(B)野生型和 eatl 突变体小孢子发育第 10 期绒毡层 TEM 图。

(C)和(D)野生型和 *eat1* 突变体小孢子发育第 10 期绒毡层与中层结合部 TEM 放大图。 脂类物质在绒毡层细胞和中层细胞之间异常积累(白色箭头)。

(E) eatl 突变体小孢子发育第 10 期绒毡层细胞内脂类物质异常积累 TEM 放大图。

(F)和(G)野生型和 eatl 突变体小孢子发育第 10 期乌氏体 TEM 放大图。与野生型乌氏体呈方形不同, eatl 突变体的乌氏体呈圆形。

(H)和(I)野生型和 eatl 突变体小孢子发育第 10 期绒毡层内表面乌氏体 SEM 图。

(J)和(K)野生型和 eatl 突变体小孢子发育第 12 期花粉壁 TEM 图。

(L)和(M)野生型和 eatl 突变体小孢子发育第 12 期花粉外壁 TEM 放大图。

(N)和(O)野生型和 eatl 突变体小孢子发育第 13 期成熟花粉 SEM 图。

T: 绒毡层 Ub: 乌氏体 Ba: 柱状层 Te: 覆盖层 Ex: 花粉外壁

比例尺=2 µm (A-B)、500 nm (C-I; L-M)、1 µm (J-K)、10 µm (N-O)

(A) and (B) The TEM analysis of tapetal cells of wild-type and *eat1* at stage 10.

(C) and (D) The magnified TEM image of junction between tapetum and middle layer of wild-type and *eat1* at stage 10. Lipid compounds abnormal accumulate (marked by white arrowheads) between tapetum and middle layer.

(E) The magnified TEM image of irregular accumulation of lipid compounds in *eat1* tapetal cell



locule at stage 10.

(F) and (G) The magnified TEM image of ubisch bodies of wild-type and *eat1* at stage 10. The *eat1* ubisch bodies are round-shaped, in contrast to the quadrate ubisch bodies in wild-type.

(H) and (I) The SEM analysis of the inner surface of tapetum of wild-type and *eat1*, showing ubisch bodies, at stage 10.

(J) and (K) The TEM analysis of pollen wall of wild-type and *eat1* at stage 12.

(L) and (M) The magnified TEM image of pollen exine of wild-type and *eat1* at stage 12.

(N) and (O) The SEM analysis of wild-type and *eat1* mature pollen at stage 13.

T: Tapetum Ub: Ubisch body Ba: Baculum Te : Tectum Ex: Exine

Bars = 2  $\mu$ m in (A-B), 500 nm in (C-I; L-M), 1  $\mu$ m in (J-K) and 10  $\mu$ m in (N-O)

### 4.2 eat1 花药转录组分析显示 EAT1 影响脂类代谢相关基因的表达

由于 EAT1 是一个 bHLH 类转录因子,为了进一步分析 EAT1 是通过影响或者改变哪些 基因的表达,从而影响脂类物质的正常代谢和转运过程,并最终影响花粉外壁的发育,我们 通过使用基因芯片的方法,在转录组水平上对比分析 eat1 突变体和野生型的基因表达差异, 来寻找 EAT1 在花药发育和花粉外壁形成过程中的分子机制。

转录组芯片结果表明,在第9期和第10期, eat1 突变体花药中分别有197个和450个 基因表达下调,其中有34个基因同时存在在这两个时期中;在第9期和第10期,分别有 277个和474个基因表达上调,其中有162个基因同时存在第9期和第10期中(图4-2A)。 总共有1192个基因在统计学意义上发生改变,频数分布图详见图4-2C。

为了进一步了解这些发生改变基因的功能,我们对表达发生变化的基因进行了 GO (Gene Ontology)功能归类分析,结果表明:在下调的基因中有 15%的基因参与到了脂类新陈代谢或者运输的途径中,其中脂类代谢相关基因占 9%,脂类转运基因占 3%,以及脂肪酸合成基因占 3% (图 4-2 B)。





**Fig 4-2 Transcriptome analysis of wild-type and** *eat1* **anthers at stage 9 and stage 10** (A) 野生型和 *eat1* 突变体第 9 期和第 10 期花药转录组数据比较。



(B) eatl 突变体第 9 期和第 10 期花药部分基因 GO(Gene Ontology)功能分析。

(C) eatl 突变体第 9 期和第 10 期花药中基因表达上下调变化——基因数量分布图。

(A)Comparison between *eat1* and wild-type transcriptome data from anthers at stage 9 and stage 10.

(B) Functional classification analysis by GO (Gene Ontology) analysis of some genes in *eat1* anthers at stage 9 and stage 10.

(C) A histogram of genes numbers with elevated or reduced expression levels in *eat1* anthers at stage 9 and stage 10.

同时,为了进一步了解这些下调基因与 EAT1 之间是否存调控关系,我们进一步通过水稻 基 因 表 达 谱 公 共 数 据 库 ( Rice Genome Annotation Project : http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml)将 613 个下调基因按照基因时空表达模式进行了分析,结果表明这些基因可以分为六个簇(图 4-3 A),其中第 4 簇 138 个基因的时空表达模式与 *EAT1* 极为接近,均在小孢子发育时期的花药中表达(图 4-3 B),这些基因和 EAT1 之 间存在着基因共表达关系,推测它们可能是受 EAT1 直接调控的。





- (A) eatl 突变体第 9 期和第 10 期花药中下调基因按照时空表达模式进行分类。
- (B) eat1 突变体第 9 期和第 10 期花药中与 EAT1 具有类似表达模式的下调基因热图。
- (A) Gene classification based on the spatial-temporal expression pattern among down-regulated



genes in *eat1* anthers at stage 9 and stage 10.

(B) The heat map of down-regulated genes which have similar expression pattern with *EAT1* in *eat1* anthers at stage 9 and stage 10.

由于上述TEM和SEM电镜分析表明在*eat1*突变体中,花粉外壁、乌氏体发育均出现异常, 而这两种结构均与脂类的代谢或者运输相关。因此,结合*eat1*转录组芯片数据和时空表达模 式分析结果,我们重点对发生变化的脂类代谢基因进行了分类分析。分类结果显示这些基因 中主要包含四大类:第一类为脂转运类(Lipid transport),包含脂类转运蛋白(Lipid Transfer Protein, LTP)和ABC转运蛋白G家族(ATP-Binding Cassette transport protein G subfamily, ABCG)两类;第二类为脂质代谢类(Lipid metabolism),包含GDSL脂肪酶(GDSLLipase) 和脂氧化酶(Lipoxygenase);第三类为酰基代谢类(Acyl metabolism);第四类为细胞色素 P450类(Cytochrome P450, CYP450s)。这四大类基因在绒毡层细胞内共同参与到不同脂类 物质的合成、修饰、转运等过程中(图4-4)。



图4-4 *eat1*突变体第9期和第10期花药中脂类代谢、转运相关基因芯片分析 Fig 4-4 The microarray analysis of lipid metabolic and transfer genes in *eat1* anthers at stage 9 and stage 10



## 4.3 LTPL64 通过影响脂类物质运输参与乌氏体和水稻花粉外壁发育

根据转录组基因芯片分析结果和EAT1和下游基因的共表达分析结果,并结合Niu Ningning等报道的ChIP-PCR、qRT-PCR和EMSA等数据<sup>[56]</sup>,我们可以推测脂类代谢和运输相关基因可能作为EAT1的下游基因参与花粉外壁形成和发育过程。

为了筛选和分析EAT1下游基因并了解它们可能存在的生物学功能,我们选取LOC\_Os03g25010、LOC\_Os03g19670、LOC\_Os07g39640(LTPL64)、LOC\_Os11g32650和LOC\_Os12g13930作为候选基因,利用RNA干扰(RNA interference)的方法降低这些基因的表达水平,以期在遗传学上获得相关证据。RNAi突变体构建候选基因如表4-1所示:

Table 4-1 The Candidate Genes for RNAi Mutant Construction			
基因座位号	别名	基因注释	S10 (log <sub>2</sub> FC)
LOC_Os03g25010	Lipase	GDSL-like lipase/acylhydrolase, putative	-4.47389
LOC_Os03g19670	Lipase	GDSL-like lipase/acylhydrolase, putative, expressed	-3.22086
LOC_Os11g32650		Chalcone synthase, putative, expressed	-4.80495
LOC_Os07g39640	LTP	LTPL64-Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, expressed	-5.84564
LOC_Os12g13930	KAR	3-oxoacyl-reductase, chloroplast precursor, putative, expressed	-4.09276

#### 表4-1 RNAi突变体构建候选基因

为了保证RNA干扰作用的特异性,我们通过对候选基因的cDNA区域进行序列分析,选取了高特异性区段作为RNA干扰靶标序列,分别构建RNAi载体并转入9522野生型中(RNAi 靶标详见附录图S-1)。

通过大田观察和对各植株的花粉进行碘染实验我们发现,相对于其他基因的RNAi突变体株系,部分*LTPL64-RNAi*株系的花药发育出现异常,花粉可育性明显降低。因此,我们着重对*LTPL64-RNAi*突变体的各个株系进行了基因型鉴定和更为细致的表型观察以及表达模式分析。

根据pTCK303-LTPL64-RNAi载体结构(图4-5 A),我们设计了阳性株系鉴定引物UBI-F, 并连同使用RNAi载体构建引物Os07g39640-F对所有11株*LTPL64-RNAi*突变体成活植株进行 了基因型鉴定,基因型鉴定结果表明以供有8株成活植株为阳性株(图4-5 B)。为了确定所 设计的RNAi靶标是否正常工作,我们取各阳性植株小孢子发育第9期和第10期的小花(突变 体花药较小,无法进行有效的材料收集,故以小花代替),提取总RNA并对LTPL64的表达进 行定量PCR分析。结果显示LTPL64在所有阳性植株小孢子发育第9期和第10期小花中的表达 量均出现下调(图4-5 C)。

我们选取了表型较为明显的株系9(*LTPL64 RNAi-9*)二分体时期(第8期早期)、四分体 时期(第8期晚期)、小孢子早期(第9期)、小孢子中期(第10期)、小孢子晚期(第11期、 第12期)和成熟期(第13期)的小花和花药进行了花药表型观察、原位杂交、扫描电子显微 镜和透射电子显微镜等分析工作。





#### 图4-5 LTPL64-RNAi突变体基因型鉴定与qRT-PCR结果

#### Fig 4-5 The results of genotyping and qRT-PCR of LTPL64-RNAi lines

- (A) LTPL64-RNAi-pTCK303载体结构与基因型鉴定设计。
- (B) LTPL64-RNAi突变体基因型鉴定结果。

(C) LTPL64-RNAi突变体小孢子发育第9期和第10期LTPL64表达水平荧光定量PCR结果。

- (A) The vector map of LTPL64-RNAi-pTCK303 and genotyping design.
- (B) The genotyping results of *LTPL64-RNAi* lines.

(C) The reduced transcript level of LTPL64 in *LTPL64-RNAi* lines by qRT-PCR at stage 9 and stage 10.

通过对比野生型、eat1突变体和LTPL64 RNAi-9突变体的花药我们可以发现,LTPL64的 缺失会严重影响水稻花药的发育,其突变体表型与eat1突变体表型接近,非常弱小(图4-6A)。 而花粉碘染结果显示几乎全部eat1突变体花粉中都没有淀粉积累,而LTPL64 RNAi-9突变体 花粉中有一半数量没有淀粉积累(图4-6A)。野生型花药的原位杂交结果则显示,在小孢子 发育时期(第9期和第10期),LTPL64在绒毡层和小孢子中特异性表达,而在使用正义探针 杂交的对照组中,只有较弱的背景信号(图4-6B),这与公共表达谱数据库中LTPL64的时空 表达模式相吻合。

通过扫描电子显微镜和透射电子显微镜,我们对LTPL64 RNAi-9突变体的小孢子和绒毡 层进行了进一步的表型分析。扫描电镜结果显示LTPL64 RNAi-9突变体的小孢子出现异常, 小孢子均出现干瘪塌陷(图4-6 C、D、E和F)从而造成雄性不育。同时乌氏体发育也出现 异常,扫描电镜显示LTPL64 RNAi-9突变体的乌氏体相较于野生型,表面更为圆滑(图4-6 G 和H),投射电镜结果更为清楚的显示LTPL64 RNAi-9突变体的乌氏体呈圆形,而野生型的乌 氏体呈方形(图4-6 I和J)。通过投射电镜,我们对LTPL64 RNAi-9突变体小孢子花粉外壁进 行了细致观察,我们惊奇地发现在突变体的花粉外壁中,柱状层也出现了缺失(图4-6 K和L), 这和eat1突变体的表型极其相似(图4-6 L和图4-1M)。而其绒毡层内也出现了少量脂类物质



的异常积累(图4-6 M和N)。



图4-6 LTPL64 RNAi-9突变体表型分析 Fig 4-6 The phenotype analysis of LTPL64 RNAi-9

(**A**)野生型(左)、*eat1*突变体(中)和*LTPL64 RNAi-9*(右)的花药(上)和花粉碘染结 果(下)对比图。比例尺=1 mm(花药)、200 μm(花粉)

(B) LTPL64在野生型小孢子发育第9期和第10期花药中的原位杂交分析。比例尺=50 μm。

(C)和(D)野生型和LTPL64 RNAi-9小孢子发育第13期成熟花粉SEM图。比例尺=100 µm。

(E)和(F)野生型和*LTPL64 RNAi-9*小孢子发育第13期成熟花粉SEM放大图。比例尺=10 μm。 (G)和(H)野生型和*LTPL64 RNAi-9*小孢子发育第13期绒毡层内表面乌氏体SEM图。比例 尺=2.5 μm。

(I)和(J)野生型和 LTPL64 RNAi-9 小孢子发育第 12 期乌氏体 TEM 放大图。与野生型乌氏体呈方形不同,LTPL64 RNAi-9 的乌氏体呈圆形。比例尺=1 μm。

(K)和(L)野生型和*LTPL64 RNAi-9*小孢子发育第12期花粉壁TEM图。比例尺=0.5 μm。
 (M)和(N)野生型和*LTPL64 RNAi-9*小孢子发育第10期绒毡层细胞TEM图。比例尺=2 μm。
 T: 绒毡层 Ub: 乌氏体 Ba: 柱状层 Te: 覆盖层 Ex: 花粉外壁



(A) The anthers (up) and I<sub>2</sub>-KI-stained pollen grains (down) comparison among wild-type (left), *eat1* (middle) and *LTP64 RANi-9 line* (right). Bars = 1 mm (anther) and 200  $\mu$ m (pollen grains).

(B) The *in situ* hybridization analysis of LTPL64 in wide type anthers at stage 9 and 10. Bars =  $50 \mu m$ .

(C) and (D) The SEM analysis of wild-type and *LTPL64 RNAi*-9 mature pollen at stage 13. Bars =  $100 \mu m$ .

(E) and (F) The magnified SEM analysis of wild-type and *LTPL64 RNAi*-9 mature pollen at stage 13. Bars = 10  $\mu$ m.

(G) and (H) The SEM analysis of the inner surface of tapetum of wild-type and *LTPL64 RNAi-9*, showing ubisch bodies, at stage 13. Bars =  $2.5 \mu m$ .

(I) and (J) The magnified TEM image of ubisch bodies of wild-type and LTPL64 RNAi-9 at stage 12. The *LTPL64 RNAi-9* ubisch bodies are round-shaped, in contrast to the quadrate ubisch bodies in wild-type. Bars = 1 µm.

(K) and (L) The TEM analysis of pollen wall of wild-type and *LTPL64 RNAi-9* at stage 12. Bars =  $0.5 \mu m$ .

(M) and (N) The TEM analysis of tapetal cells of wild-type and *LTPL64 RNAi-9* at stage 10. Bars =  $2 \mu m$ .

T: Tapetum Ub: Ubisch body Ba: Baculum Te : Tectum Ex: Exine

这些分析结果有力的证明了LTPL64作为植物脂类转运蛋白家族(Lipid Transfer Protein, LTP)的一员,受EAT1调控,通过影响脂类物质运输参与水稻乌氏体和花粉外壁发育,并最 终影响小孢子的发育过程。

# 4.4 tdr 与 eat1 转录组芯片数据比较分析

2008年,我们实验室张大生等报道了另一个 bHLH 类转录因子 TDR。TDR 通过调控包括 OsC6/LTPL68 等一系列下游基因参与脂类代谢、运输和绒毡层细胞程序性死亡等过程,从而影响水稻小孢子的发育<sup>[57]</sup>。为了进一步确定 EAT1 作为 TDR 下游基因中一个重要的 bHLH 类转录因子<sup>[44]</sup>,其调控功能与 TDR 是否存在重叠?同时,他们对于下游脂类代谢和运输相关基因的调控是协同作用还是拮抗作用?我们对比分析了 tdr 与 eat1 转录组芯片的数据。

比较结果分析表明, tdr 与 eat1 转录组芯片的数据中下调基因具有明显的重叠。在 eat1 中共有 613 个基因下调,在 tdr 中共有 1161 个基因下调,而同时在两个突变体中都下调的 基因有 210 个,分别占 eat1 和 tdr 突变体中下调基因的 34.26%和 18.09% (图 4-7 A)。进一步的 GO 功能分析则表明这些重叠的下调基因中包含了许多脂类代谢和转运相关的基因(图 4-7 B)。





#### 图4-7 eat1和tdr突变体转录组基因芯片与GO基因功能分析比较

#### Fig 4-7 The microarray and GO analysis comparison between eat1 and tdr anthers

(A) eat1 和 tdr 突变体芯片基因比较。

(B) eat1 和 tdr 突变体芯片下调基因 GO 基因功能分析比较。

(A) The comparison between *eat1* and *tdr* microarray.

(B) The comparison of GO analysis results among down-regulated genes in eat1 and tdr microarray.

我们将 eat1 和 tdr 突变体第 10 期花药转录组分析中有表达变化的脂类代谢和脂类转运 相关基因进行了进一步比较分析,结果发现在 CYP450 家族中,有且只有一个基因 LOC\_Os04g48210 在 eat1 和 tdr 突变体中均出现下调;而在 LTP 家族中,只有 LTPL64 和 LTPL68/OsC6 在 eat1 和 tdr 突变体中均出现下调;在 Lipase 家族中,LOC\_Os01g43140、 LOC\_Os06g43044、LOC\_Os06g34070 和 LOC\_Os02g09620 四个基因同时下调;其余基因中 大部分均只在 eat1 或 tdr 突变体中单独上调或下调(图 4-8)。

因此,我们推测 TDR 和 EAT1 在对脂类代谢和转运相关基因的调控上的确存在功能上的重叠,而对于不同基因的调控模式上,可能存在差异。





图4-8 eat1和tdr突变体第10期花药中脂类代谢、脂类转运和细胞死亡基因芯片比较 Fig 4-8 The microarray comparison between genes involved in lipid metabolism, lipid transfer and cell death of eat1 and tdr anthers at stage 10

# 4.5 双荧光素酶报告实验显示 TDR 和 EAT1 单独或共同调控下游靶标

# 基因的表达

由于 TDR 和 EAT1 同属于 bHLH 类转录因子,且时空表达模式和下游基因均存在重叠, 而 bHLH 类转录因子可以形成同源二聚体或异源二聚体来调控下游基因,因此我们猜想这两 个转录因子是否可以通过形成不同的二聚体(TDR/TDR 同源二聚体、EAT1/EAT1 同源二聚 体和 TDR/EAT1 异源二聚体),来产生不同的调控效果。

Niu Ningning 等在阐述 EAT1 对绒毡层细胞 PCD 的调控时曾通过酵母双杂交实验证明了 EAT1 和 TDR 可以存在相互作用<sup>[44]</sup>。在 2014 年, Ko, Swee-Suak 等人也通过蛋白质空间结构分析预测 EAT1 和 TDR 可以形成异源二聚体<sup>[58]</sup>。为了明确这两个转录因子以何种形式调 控下游基因,我们根据芯片数据并结合 Niu Ningning、Zhang Dasheng 等人的 ChIP 和 EMSA 数据<sup>[43, 56]</sup>挑选了 LOC\_Os04g48210、LTPL64 和 LTPL68/OsC6 三个候选基因,开展了双荧光 素酶报告实验。

实验结果显示出了两种不同情况,第一种以对 LTPL64 和 LOC\_Os04g48210 启动子的调 控为例:当 EAT1 或者 TDR 单独存在时,LTPL64 启动子的表达活性相对于对照组分别提高 了 1.7 倍和 1.5 倍,LOC\_Os04g48210 启动子的表达活性相对于对照组分别提高了 1.3 倍和 1.3 倍,当 EAT1 和 TDR 同时存在时,LTPL64 启动子的表达活性提高了 2.6 倍,LOC\_Os04g48210 启动子的表达活性提高了 2.1 倍;而对 OsC6 启动子的调控则呈现另外一



种情况:当 EAT1 或者 TDR 单独存在时,OsC6 启动子区域的表达活性相对于对照组分别提高了 4.2 倍和 1.6 倍,当 EAT1 和 TDR 同时存在时,表达活性则显著提高,达到 33.8 倍(图 4-9)。



图4-9 LOC\_Os04g48210、LTPL64和LTPL68/OsC6启动子受TDR和EAT1共同调控 Fig 4-9 LOC\_Os04g48210, LTPL64 and LTPL68/OsC6 promoters are co-regulated by EAT1 and TDR.

# 4.6讨论:TIP2、TDR、EAT1 三者的调控关系与下游基因的功能

在绒毡层分化、发育、营养物质的合成与运输,以及凋亡的过程中,转录因子对下游基因的表达调控起到了至关重要的作用。除了前述的 TDR 和 EAT1 之外,在水稻小孢子发育的过程中还有另一个 bHLH 类转录因子 TDR INTERACTING PROTEIN 2 (TIP2)。

Fu Zhenzhen 等在 2014 年阐明了 TIP2 在花药早期发育中对绒毡层细胞分化所起的重要 作用<sup>[59]</sup>。而从基因时空表达模式来看,TIP2、TDR 和 EAT1 均在绒毡层表达,但时间上具 有表达次序性:TIP2 最先表达,然后是 TDR,最后是 EAT1 (图 4-10 A)。野生型小孢子发 育第 6 期到第 10 期花药的定量 PCR 结果也显示出了同样的时间表达次序性 (图 4-10 B)。 我们比较了 TIP2、TDR 和 EAT1 在 *tip2、tdr* 和 *eat1* 三个突变体中表达量变化,发现 EAT1 在 三个突变体中表达量均显著下降,而 TDR 和 TIP2 在 *eat1* 突变体中表达量并没有变化 (图 4-10 C)。之前有研究表明这三者之间存在直接调控关系,TIP2 作为上游,调控 TDR 表达,而 TDR 则调控 EAT1 表达,同时 TIP2 和 EAT1 一样,与 TDR 存在相互作用,异源二聚体 TIP2/TDR 共同调控 EAT1 表达<sup>[44, 58, 59]</sup> (图 4-10 D)。





# 图4-10 TIP2、TDR和EAT1三者的调控关系分析 Fig 4-10 The regulation analysis among TIP2, TDR and EAT1

- (A) TIP2、TDR 和 EAT1 时空表达模式分析。
- (B) TIP2、TDR 和 EAT1 在野生型小孢子发育第6期到第10 期花药中的定量 PCR 分析。
- (C) TIP2、TDR 和 EAT1 在 tip2、tdr 和 eat1 三个突变体中的表达量变化。
- (D) TIP2、TDR 和 EAT1 三者的相互调控关系。
- (A) The expression pattern analysis of TIP2, TDR and EAT1.
- (B) The qRT-PCR analysis of TIP2, TDR and EAT1 in wild-type anther from stage 6 to stage 10.
- (C) The expression change of TIP2, TDR and EAT1 in *tip2*, *tdr* and *eat1* mutant respectively.
- (D) The regulation model among TIP2, TDR and EAT1.

TIP2、TDR 和 EAT1 这三个转录因子除了存在相互作用和相互调控外,其对下游其他 绒毡层细胞分化、发育、营养物质的合成与转运,以及凋亡相关的基因也存在调控的差异。 结合转录组芯片数据和 GO 功能分类分析,我们推测这三个 bHLH 类转录因子在调控绒毡层 和小孢子外壁正常发育的过程中存在分工。TIP2 在早期调控绒毡层细胞命运决定与分化相 关基因的表达,并与TDR形成异源二聚体调控EAT1的表达,其后EAT1的出现替代了TIP2, 与 TDR 形成异源二聚体; TDR/TDR 同源二聚体、TDR/EAT1 异源二聚体和 EAT1/EAT1 同 源二聚体则主要调控绒毡层发育、营养物质的合成运输以及绒毡层细胞凋亡相关的基因表达。 EAT1 和 TDR 在对下游基因进行正表达调控时很可能存在两种模式,第一种为相互独立调 控,即 EAT1 和 TDR 通过分别形成同源二聚体结合在目标基因启动子不同的 E-box 区域, 从而单独或者同时调控下游基因表达;第二种为协同调控,即 EAT1 和 TDR 可能通过形成 异源二聚体结合在目标基因启动子 E-box 区域,调控下游基因表达。相对于相互独立调控, 协同调控可以显著加强下游基因的表达。而实际在植物体内,这两种模式可能既可以在不同 调控通路中发挥作用,也可以在相同调控通路中形成时间上的延续性,从而增加调控网络的 复杂性,增强系统的鲁棒性。(图 4-11)。





**Pollen Exine Morphogenesis** 

# 图4-11 TIP2、TDR和EAT1参与绒毡层发育和花粉外壁调控模型

#### Fig 4-11 A proposed scheme showing the central role of TIP2, TDR and EAT1 in tapetum and pollen exine development

EAT1 作为 TDR 和 TIP2 的下游在核内被 TIP2/TDR 异源二聚体激活转录。TDR/TDR 同源二 聚体、EAT1/EAT1 同源二聚体和 TDR/EAT1 异源二聚体通过调控绒毡层细胞凋亡相关基因 (OsAP25, OsAP37 和 OsCP1)和脂类代谢、转运以及和乌氏体形成花粉外壁模式建成相关基 因(CYPs/704b2/703A, WBCs, GDSL lipases, Chalcone synthase, KCSs 和 LTPLs/68/64)参与花粉 外壁发育。

EAT1 acts downstream of TDR and TIP2 and is activated by TIP2/TDR heterodimer in the nucleus. TDR/TDR homodimer, EAT1/EAT1 homodimer and TDR/EAT1 heterodimer act as key transcriptional regulators that modulate the expression of genes associated with tapetum cell death (OsAP25, OsAP37 and OsCP1); lipid metabolism and transport, ubisch bodies formation, pollen exine morphogenesis (*CYPs/704b2/703A*, *WBCs*, *GDSL lipases*, *Chalcone synthase*, *KCSs* and *LTPLs/68/64*) during pollen exine development in rice.



# 第五章 总结与展望

#### 5.1 EAT1 和 TDR 通过共同调控脂类代谢和运输相关基因,参与水稻

#### 乌氏体和花粉外壁的发育过程

绒毡层作为在花药中最接近小孢子的细胞层,其分化、发育、营养物质的合成与运输以 及 PCD 过程与小孢子的正常发育密切相关,尤其在小孢子花粉外壁正常形成过程中起着至 关重要的作用。有研究表明,花粉外壁的发育过程是由绒毡层和小孢子共同参与作用的,小 孢子首先在表面形成初生外壁模板,该模板决定了细胞外壁前体物质在小孢子表面的沉积模 式,然后绒毡层细胞通过极性运输和 PCD 等方式,释放其内容物以提供花粉正常发育所需 的营养物质和花粉外壁形成所需的前体物质(孢粉素、含油层等)<sup>[10, 60, 61]</sup>。然而我们对花 粉外壁形成的分子机制仍然知之甚少。

我们获得了一株突变体 eat1,除了已被报道 EAT1 作为一个在绒毡层和小孢子发育过程 起重要作用的 bHLH 类转录因子,其功能缺失会严重影响绒毡层的正常 PCD 过程,从而导 致小孢子不育<sup>[44]</sup>,我们还发现其乌氏体形态异常、绒毡层细胞内和绒毡层-中层结合部有脂 类物质的异常积累、花粉外壁柱状层缺失。通过对 eat1 突变体小孢子发育第 9 期和第 10 期 花药转录组芯片分析,我们发现至少 1192 个基因在统计学意义上发生了改变,其中有 611 个基因下调。GO 基因功能分类分析结果显示,在这些下调基因中,有 15%为脂类代谢和转 运相关基因。通过对这些基因的时空表达模式的进一步分析并与 EAT1 相比较,同时结合 qRT-PCR、EMSA、ChIP-PCR 等实验数据,我们选取了 LOC\_Os03g25010、LOC\_Os03g19670、 LOC\_Os07g39640 (LTPL64)、LOC\_Os11g32650 和 LOC\_Os12g13930 作为候选基因用于构 建 RNA 干扰突变体。

通过大田表型观察和花粉碘染等实验我们发现 LTPL64-RNAi 突变体的花粉育性出现明显下降。通过对 LTPL64-RNAi 突变体花药的观察、原位杂交和电子显微镜表型分析进一步发现 LTPL64 的表达下降会影响花药、乌氏体和花粉外壁的正常发育。LTPL64-RNAi 突变体的花药弱小,乌氏体呈圆形而非正常野生型的方形,花粉外壁柱状层出现缺失。这些表型与eatl 突变体的表型非常相似。

TDR 是另一个在绒毡层和小孢子发育过程起重要作用的 bHLH 类转录因子。我们比较 了 tdr 和 eat1 的转录组芯片结果发现其下调基因之间存在大量的重叠。而 LTPL64 和 LTPL68/OsC6 是仅有的在两者中都下调的脂转运蛋白(LTP)。而在 CYP 家族中 LOC\_Os04g48210 也在两者中都下调。由于 bHLH 转录因子可以分别形成同源二聚体和异源 二聚体来调控下游靶标基因的表达,同时也有研究表明 EAT1 和 TDR 之间存在相互作用<sup>[44, 58, 59]</sup>。我们选取了 LTPL64、LTPL68/OsC6 和 LOC\_Os04g48210,使用双荧光素酶报告系统实 验分析了 TDR 和 EAT1 如何调控下游基因的表达。实验结果出现两种模式,以对 LTPL64 和 LOC\_Os04g48210 启动子的调控为例: 当 EAT1 或者 TDR 单独存在时,LTPL64 启动子的 表达活性相对于对照组分别提高了 1.7 倍和 1.5 倍,LOC\_Os04g48210 启动子的表达活性相 对于对照组分别提高了 1.3 倍和 1.3 倍,当 EAT1 和 TDR 同时存在时,LTPL64 启动子的表 达活性提高了 2.6 倍,LOC\_Os04g48210 启动子的表达活性提高了 2.1 倍;而对 OsC6 启动 子的调控则呈现另外一种情况:当 EAT1 或者 TDR 单独存在时,OsC6 启动子的表达活性相



对于对照组分别提高了 4.2 倍和 1.6 倍,当 EAT1 和 TDR 同时存在时,表达活性则显著提高,达到 33.8 倍。

综上所述,我们认为 EAT1 和 TDR 在水稻小孢子的发育过程中,可以通过形成不同二 聚体(TDR/TDR 同源二聚体、EAT1/EAT1 同源二聚体和 TDR/EAT1 异源二聚体)的形式, 单独或共同调控 LTPL64、LTPL68/OsC6 等脂类代谢和运输相关基因的表达,从而参与乌氏 体和花粉外壁的形成。

### 5.2 后续工作展望

尽管我们通过基因芯片、RNA 干扰突变体构建和一系列生理生化方法对 EAT1 和 TDR 如何共同参与调控花粉外壁发育的过程进行了分析研究,但这些结果仍然无法完全解释花粉 外壁发育的详细机理,今后仍然还有许多工作需要进一步深入。主要包括如下几个方面:

(1)我们推测 EAT1 和 TDR 可以通过形成同源二聚体或者异源二聚体的形式,单独或 共同调控下游基因的表达,但是对于不同基因,如何确定其调控模式仍然需要我们通过 ChIP-seq、qRT-PCR 等实验进行进一步分析验证。

(2) 在双荧光素酶报告系统实验中,我们发现对于同一个基因的启动子区域,不同二 聚体的调控效果可能会出现较大差异。是否是因为不同二聚体的 DNA 结合位点不同,导致 结合后染色体空间结构变化不同,从而造成转录活性的差异;或者由于不同二聚体可以招募 不同核蛋白从而形成的转录起始复合体的转录活性有区别?我们下一步会通过 Co-IP、质谱 仪检测等手段进行更加细致的分析。

(3)由于 LTPL64 基因的缺失会导致花粉外壁柱状层的缺失,那么是什么物质构成了 花粉外壁的柱状层结构?由于 *LTPL64-RNAi* 株系的部分花粉是可育的,我们后期将会收集 各株系的花粉进行脂类测定,以期发现是哪一类脂类物质发生重大改变,从而造成花粉外壁 柱状层的缺失,同时也希望可以由此确定 LTPL64 的底物。

(4)相较于植物研究中另一种模式植物——拟南芥,水稻花粉外壁发育机理的研究仍 然非常初步。我们将通过进化分析等手段,将水稻和拟南芥两个物种中有关绒毡层和花粉外 壁发育的同源基因进行功能上的比较分析,从而更进一步阐明水稻花粉外壁发育的生理过程, 也为更好的理解单、双子叶植物之间的物种进化提供证据。

在转基因食品安全问题仍然存在争议的今天,通过传统的杂交方式,尤其是通过雄性不 育系的方式对水稻进行育种和增产仍然是最重要的科学手段。因此,把水稻花粉发育过程中 各个基因的功能、相互之间的调控关系研究透彻,并利用这些知识更好的培育优质高产的水 稻品种、造福人类,将会成为我们研究的最大动力。相信通过各界同仁的共同努力,这一目 标会在不久的将来实现。



# 参考文献

[1] Pleasants J M, Hellmich R L, Dively G P, et al. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(21): 11919-24.

[2] Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, et al. Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2004, 39(2): 170-81.

[3] Guan Y-F, Huang X-Y, Zhu J, et al. RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2008, 147(2): 852-63.

[4] Scott R J, Spielman M, Dickinson H G. Stamen structure and function [J]. The Plant Cell, 2004, 16(suppl 1): S46-S60.

[5] Jiang J, Zhang Z, Cao J. Pollen wall development: the associated enzymes and metabolic pathways [J]. Plant Biology, 2013, 15(2): 249-63.

[6] Ariizumi T, Toriyama K. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development [J]. Annual review of plant biology, 2011, 62(437-60.

[7] Li H, Zhang D. Biosynthesis of anther cuticle and pollen exine in rice [J]. Plant signaling & behavior, 2010, 5(9): 1121-3.

[8] Brett C T, Waldron K W. Physiology and biochemistry of plant cell walls [M]. Springer Science & Business Media, 1996.

[9] Piffanelli P, Ross J H, Murphy D. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains [J]. Sexual plant reproduction, 1998, 11(2): 65-80.

[10] Blackmore S, Wortley A H, Skvarla J J, et al. Pollen wall development in flowering plants [J]. New Phytologist, 2007, 174(3): 483-98.

[11] Dong X, Hong Z, Sivaramakrishnan M, et al. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2005, 42(3): 315-28.

[12] Enns L C, Kanaoka M M, Torii K U, et al. Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility [J]. Plant molecular biology, 2005, 58(3): 333-49.

[13] Shi X, Sun X, Zhang Z, et al. GLUCAN SYNTHASE-LIKE 5 (GSL5) plays an essential role in male fertility by regulating callose metabolism during microsporogenesis in rice [J]. Plant and Cell Physiology, 2014, pcu193.

[14] Paxson-Sowders D M, Dodrill C H, Owen H A, et al. DEX1, a novel plant protein, is required for exine pattern formation during pollen development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2001, 127(4): 1739-49.

[15] Sun M-X, Huang X-Y, Yang J, et al. *Arabidopsis* RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage [J]. Plant reproduction, 2013, 26(2): 83-91.

[16] Chang H-S, Zhang C, Chang Y-H, et al. No primexine and plasma membrane undulation is essential for primexine deposition and plasma membrane undulation during microsporogenesis in *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2012, 158(1): 264-72.



[17] Hu J, Wang Z, Zhang L, et al. The *Arabidopsis* Exine Formation Defect (EFD) gene is required for primexine patterning and is critical for pollen fertility [J]. New Phytologist, 2014, 203(1): 140-54.

[18] Hird D L, Worrall D, Hodge R, et al. The anther-specific protein encoded by the Brassica napus and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to  $\beta$ -1, 3-glucanases [J]. The Plant Journal, 1993, 4(6): 1023-33.

[19] Wan L, Zha W, Cheng X, et al. A rice  $\beta$ -1, 3-glucanase gene Osg1 is required for callose degradation in pollen development [J]. Planta, 2011, 233(2): 309-23.

[20] Aarts M, Keijzer C J, Stiekema W J, et al. Molecular characterization of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility [J]. The Plant Cell, 1995, 7(12): 2115-27.

[21] Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, et al. A novel male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana*, faceless pollen-1, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine [J]. Plant molecular biology, 2003, 53(1-2): 107-16.

[22] Haslam T M, Haslam R, Thoraval D, et al. ECERIFERUM2-LIKE proteins have unique biochemical and physiological functions in very-long-chain fatty acid elongation [J]. Plant physiology, 2015, 167(3): 682-92.

[23] Jessen D, Olbrich A, Knüfer J, et al. Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2011, 68(4): 715-26.

[24] Polowick P, Sawhney V. Differentiation of the tapetum during microsporogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*), with special reference to the tapetal cell wall [J]. Annals of botany, 1993, 72(6): 595-605.

[25] Bedinger P. The remarkable biology of pollen [J]. The Plant Cell, 1992, 4(8): 879-87.

[26] Chen W, Yu X-H, Zhang K, et al. Male Sterile2 encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2011, 157(2): 842-53.

[27] Shi J, Tan H, Yu X-H, et al. Defective pollen wall is required for anther and microspore development in rice and encodes a fatty acyl carrier protein reductase [J]. The Plant Cell, 2011, 23(6): 2225-46.

[28] Li H, Pinot F, Sauveplane V, et al. Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the  $\omega$ -hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice [J]. The Plant Cell, 2010, 22(1): 173-90.

[29] Yang X, Wu D, Shi J, et al. Rice CYP703A3, a cytochrome P450 hydroxylase, is essential for development of anther cuticle and pollen exine [J]. Journal of integrative plant biology, 2014, 56(10): 979-94.

[30] Dobritsa A A, Shrestha J, Morant M, et al. CYP704B1 is a long-chain fatty acid  $\omega$ -hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2009, 151(2): 574-89.

[31] Morant M, Jørgensen K, Schaller H, et al. CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen [J]. The Plant Cell, 2007, 19(5): 1473-87.

[32] de Azevedo Souza C, Kim S S, Koch S, et al. A novel fatty acyl-CoA synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2009, 21(2): 507-25.



[33] Dobritsa A A, Lei Z, Nishikawa S-i, et al. LAP5 and LAP6 encode anther-specific proteins with similarity to chalcone synthase essential for pollen exine development in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant physiology, 2010, pp. 110.157446.

[34] Kim S S, Grienenberger E, Lallemand B, et al. LAP6/POLYKETIDE SYNTHASE A and LAP5/POLYKETIDE SYNTHASE B encode hydroxyalkyl  $\alpha$ -pyrone synthases required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell, 2010, 22(12): 4045-66.

[35] Grienenberger E, Kim S S, Lallemand B, et al. Analysis of TETRAKETIDE  $\alpha$ -PYRONE REDUCTASE function in *Arabidopsis thaliana* reveals a previously unknown, but conserved, biochemical pathway in sporopollenin monomer biosynthesis [J]. The Plant Cell, 2010, 22(12): 4067-83.

[36] Lallemand B, Erhardt M, Heitz T, et al. Sporopollenin biosynthetic enzymes interact and constitute a metabolon localized to the endoplasmic reticulum of tapetum cells [J]. Plant physiology, 2013, 162(2): 616-25.

[37] Zhang D, Li H. Exine export in pollen [M]. Plant ABC Transporters. Springer. 2014: 49-62.

[38] Zhu L, Shi J, Zhao G, et al. Post-meiotic deficient anther1 (PDA1) encodes an ABC transporter required for the development of anther cuticle and pollen exine in rice [J]. Journal of Plant Biology, 2013, 56(1): 59-68.

[39] Choi H, Jin J Y, Choi S, et al. An ABCG/WBC - type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen [J]. The Plant Journal, 2011, 65(2): 181-93.

[40] Quilichini T D, Samuels A L, Douglas C J. ABCG26-mediated polyketide trafficking and hydroxycinnamoyl spermidines contribute to pollen wall exine formation in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2014, 26(11): 4483-98.

[41] Choi H, Ohyama K, Kim Y-Y, et al. The role of *Arabidopsis* ABCG9 and ABCG31 ATP binding cassette transporters in pollen fitness and the deposition of steryl glycosides on the pollen coat [J]. The Plant Cell, 2014, 26(1): 310-24.

[42] Li J, Huang Y, Tan H, et al. An endoplasmic reticulum magnesium transporter is essential for pollen development in *Arabidopsis* [J]. Plant Science, 2015, 231(212-20.

[44] Niu N, Liang W, Yang X, et al. EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice [J]. Nature Communications, 2013, 4(1445-55.

[45] Suwabe K, Suzuki G, Takahashi H, et al. Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray [J]. Plant and cell physiology, 2008, 49(10): 1407-16.

[46] Chen L, Chu H, Yuan Z, et al. Isolation and genetic analysis for rice mutants treated with 60 Co  $\gamma$ -Ray [J]. J Xiamen Univ, 2006, 45(82-5.

[47] Murray M, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic acids research, 1980, 8(19): 4321-6.

[48] Verwoerd T C, Dekker B, Hoekema A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs [J]. Nucleic acids research, 1989, 17(6): 2362.

[49] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning [M]. Cold spring harbor laboratory



press New York, 2001.

[50] Xu J, Yang C, Yuan Z, et al. The ABORTED MICROSPORES regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell, 2010, 22(1): 91-107.

[51] Liu H, Yu X, Li K, et al. Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis* [J]. Science, 2008, 322(5907): 1535-9.

[52] Hellens R P, Allan A C, Friel E N, et al. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants [J]. Plant methods, 2005, 1(1): 1-14.

[53] Zhang D, Luo X, Zhu L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2011, 38(9): 379-90.

[54] Huysmans S, El-Ghazaly G, Smets E. Orbicules in angiosperms: morphology, function, distribution, and relation with tapetum types [J]. The Botanical Review, 1998, 64(3): 240-72.

[55] Furness C A, Rudall P J. The tapetum and systematics in monocotyledons [J]. The Botanical Review, 1998, 64(3): 201-39.

[56] Ningning N. The bHLH Transcriptional Factor EAT1 Is Essential for Rice Tapetal PCD and Microspore Development [D]. Shanghai; School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, 2013.

[57] Zhang D-S, Liang W-Q, Yuan Z, et al. Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development [J]. Molecular plant, 2008, 1(4): 599-610.

[58] Ko S-S, Li M-J, Ku M S-B, et al. The bHLH142 transcription factor coordinates with TDR1 to modulate the expression of EAT1 and regulate pollen development in rice [J]. The Plant Cell, 2014, 26(6): 2486-504.

[59] Fu Z, Yu J, Cheng X, et al. The rice basic helix-loop-helix transcription factor TDR INTERACTING PROTEIN2 is a central switch in early anther development [J]. The Plant Cell, 2014, 26(4): 1512-24.

[60] Rowley J R. Stranded arrangement of sporopollenin in the exine of microspores of Poa annua[J]. Science, 1962, 137(3529): 526-8.

[61] Heslop-Harrison J. Wall pattern formation in angiosperm microsporogenesis [C].Proceedings of the Symposia of the Society for Experimental Biology, 1971: 277.



# 谢辞

本毕业设计是在许杰副教授的悉心指导下完成的。在整个课题的进行过程中,还有许多 老师同学和亲人朋友给与了我各种帮助和支持。在此,我向他们致以我最真挚的的感谢。

首先,我想先感谢我的班导师张大兵教授。在大学本科期间,张老师作为我们的班导师, 时常和我们交流,分享他的人生经验和科研历程。我还记得他在第一次班会时曾经说过:"当 你看到路边的一片落叶,可以试着问一些问题。为什么落叶是黄的?为什么它会凋落?然后 再给出一些假设并尝试验证它们,这就是科学。"对于当时懵懂的,虽然梦想成为科学家却 还不明白科学是什么的我来说,这句话犹如一盏明灯,使我豁然开朗。在课堂学习看书和平 时阅读文献时我也开始学着提出疑问,并给出自己的推测。张老师曾两次推荐我到国外著名 大学进行暑期交流。第一次是大一的暑假,他推荐了我去剑桥大学参加暑期学校,在那里我 接触到了不同生物领域的研究方向,领悟了国外的科研文化和实验室氛围;而在大三暑假, 张老师还特别联系了英国牛津大学的 Hugh Dickinson 教授,推荐我到那里进行实验室实习。 通过这些国外科研经历,我不仅开阔了视野,认识了来自不同地方的教授和朋友,还提升了 英语能力。除此之外,张老师在整个课题的进行过程中也给予了很多指导性的建议。他敏锐 的科学头脑和国际化的视野使我受益匪浅。

然后,我想对许杰副教授表达我最由衷的感谢。当我第一次进入实验室的时候,是许老师手把手地教我设计实验、处理数据;许老师为整个课题付出了巨大的精力和时间,在实验 设计、课题讨论、论文的写作和修改过程中给予了我无私的帮助。他清晰的逻辑思路和对科 学问题的独特见解潜移默化地提高了我独立思考和科研的能力。除了在科研上对我的照顾, 许老师作为我们的班主任,也对大家的生活非常关心,常组织大家春游踏青、聚餐交谈。增 进了同学间的友谊,使整个班级更加团结。两位老师对科学研究的热情、严谨的工作态度和 对同学们的无限关爱深深影响着我。

衷心感谢实验室各位老师对我的科研工作给予的支持和帮助:余婧老师帮助完成了 35s-TDR-pGreenII 0000的载体构建工作;尹长松老师指导了原位杂交实验;陈明姣和罗致靖 老师帮助进行了水稻种植;杨素珍老师提供了实验器材;梁婉琪老师和袁政老师也对课题提 出了宝贵的建议。

衷心感谢实验室的各位学长学姐的帮助:和王瑞丰学长在课题方面的讨论使我的思维更 加严谨;陈旭学长教会了我如何进行电子显微镜的操作和材料的制作;汤龙军、贾茹、林森、 李刚、余君萍、何漪等学长学姐给了我热心的帮助和有益的建议;还有许多同学和师长在实 验室工作中给予了我关心和理解,篇幅所限无法在此一一列举。

特别感谢我的家人对我学业的支持和奉献。我的父母和家人始终如一地理解和关心我。 他们作为我最坚强的后盾,尊重和支持我的每一次选择,并给予我坚定前行的决心和战胜困 难的勇气。

最后,我想感谢自己。感谢自己在面对致远学院无情的拒绝时不服输的目光;感谢自己 在那一年不顾他人诧异的眼光,坚持选择转专业到生物科学的勇气;感谢自己在无数夜深人 静的时候,仍然努力完成实验的坚持;感谢自己做的每一个选择。我的梦想是成为科学家, 而在实现梦想的道路上,梦想会一直伴我左右。



# 附录

表	€S-1 弓	牧	「序列	
Supplemental	table	1	$\operatorname{Primer}$	sequence

Primer Name	Sequence(5' 3')	Purpose
EAT1 cDNA-F	AACTGCAGATGATTGTTGGGGGCTGGTTA	Dual-LUC
EAT1 cDNA-R	GGACTAGTTTAGTTGAATATGTCGAGGGC	Dual-LUC
OsC6 pro-F	AACTGCAGTAAAACCAACCACCTATAGTGTCAT	Dual-LUC
OsC6 pro-R	GGACTAGTTCTAGCTAAATGTGGATTAGAGCT	Dual-LUC
04g48210 pro-F	GGGGTACC TTTGCTGGGGGATCATGGCGTGT	Dual-LUC
04g48210 pro-R	CATGCCATGGCTGCACGCGTGTAATAT	Dual-LUC
07g39640 pro-F	CCCAAGCTTCATGGGCAGCCGCTCGTTCC	Dual-LUC
07g39640 pro-R	CATGCCATGGGATCTTCTCTGCATTGTGCG	Dual-LUC
Os07g39640s-F	TAATACGACTCACTATAGGGCACACGTGGGTCATC	in situ
C	TCCTTG	
Os07g39640s-R	TGGCACTGTTTCCGTGTAGC	in situ
Os07g39640a-F	CACACGTGGGTCATCTCCTTG	in situ
Os07g39640a-R	TAATACGACTCACTATAGGGTGGCACTGTTTCCGT	in situ
C	GTAGC	
Os03g19670-F	CGGGGTACCACTAGTACGATTTCATCAACAACTAC	RNAi
Os03g19670-R	GCGGGATCCGAGCTCAGAACACGTACTTGGACCTG	RNAi
Os03g25010-F	CGGGGTACCACTAGTATGGCTTCTTCTAGGTCGT	RNAi
Os03g25010-R	GCGGGATCCGAGCTCTCGCCAGGTGACCACCA	RNAi
Os07g39640-F	CGGGGTACCACTAGTTTGCCGGAGAGCAAGAAATG	RNAi
Os07g39640-R	GCGGGATCCGAGCTCGTGGCACTGTTTCCGTGTAG	RNAi
Os11g32650-F	CGGGGTACCACTAGTAAGGAGAAGTTCAAGAGGAT	RNAi
Os11g32650-R	GCGGGATCCGAGCTCCACCGTGCCGCCGGCGAA	RNAi
Os12g13930-F	CGGGGTACCACTAGTTGAAGAAGTGTGCAGAGAGA	RNAi
Os12g13930-R	GCGGGATCCGAGCTCTTCACATTGATGTTTCTGCT	RNAi
UBI-F	ATGCCGTGCACTTGTTTGTC	Genotyping
Os07g39640-F	ACGTGGGTCATCTCCTTGCT	Genotyping
06g23360-RT-F	CGTCGTAATGCCTCCATCCA	qRT-PCR
06g23360-RT-R	GGTGTGTTCTGATCCCCTCG	qRT-PCR
02g08010-RT-F	TGGCTACTGAACCACCAACA	qRT-PCR
02g08010-RT-R	AAACACCTGACAAAGCACAA	qRT-PCR
07g39640-RT-F	ACGTGGGTCATCTCCTTGCT	qRT-PCR
07g39640-RT-R	GGCTGCTCCTTCCATTTCTTG	qRT-PCR
OsActin-F	CCTTCAACACCCCTGCTATG	qRT-PCR
OsActin-R	CAATGCCAGGGAACATAGTG	qRT-PCR



表S-2 在 eat 1 突变体花药中表达有变化且与脂类代谢相关的基因

Supplemental table 2 List of differential expressed genes related to lipid

|--|

Fold change (Log2)			
Gene ID	Stage 9	Stage 10	Annotation
		Acyl mo	etabolism
LOC_Os09g19650	-1.24	-0.55	3-ketoacyl-CoA synthase precursor
LOC_Os03g12030	0.16	1.11	3-ketoacyl-CoA synthase
LOC_Os11g37900	0.64	1.39	3-ketoacyl-CoA synthase
LOC_Os05g49900	0.72	-1.14	3-ketoacyl-CoA synthase
LOC_Os12g13930	0.6	-4.09	3-oxoacyl-reductase
LOC_Os07g42420	-1.05	-1	3-oxoacyl-synthase
LOC_Os03g05780	-0.41	-1.61	4-coumarateCoA ligase-like 7
LOC_Os12g04990	0.19	1.29	Acyl-CoA synthetase protein
LOC_Os05g07090	0.73	1.04	Acyl-coenzyme A dehydrogenase
LOC_Os05g03480	0.83	1.31	Acyl-coenzyme A dehydrogenase
LOC_Os08g09950	-1.36	-2.34	Acyl-desaturase
LOC_Os08g10010	-0.88	-1.24	Acyl-desaturase
LOC_Os01g65830	2.58	2.14	Acyl-desaturase
		Lipid m	etabolism
LOC_Os03g07140	-1	-2.07	Fatty acyl carrier protein reductase
LOC_Os04g56240	-1.09	-0.7	Lipase
LOC_Os01g43140	-0.99	-1.34	Lipase
LOC_Os05g29974	0.26	-1.31	Lipase
LOC_Os12g37260	0.96	2.55	Lipoxygenase
LOC_Os08g39850	0.41	1.39	Lipoxygenase
LOC_Os03g49380	1.41	1.5	Lipoxygenase
LOC_Os03g52860	1.88	2.25	Lipoxygenase
LOC_Os03g25010		-4.47	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os02g57110	-1.21	-0.76	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os02g01140	-1.09	-0.36	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os02g09620	-1.05	-0.77	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os06g43044	-0.93	-2.72	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os06g34070	-0.37	-2.59	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os03g19670	0.23	-3.22	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os01g46080	0.25	-1.68	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os12g17570	0.81	2	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os08g45150	1.39	0.3	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os02g01980	1.45	-0.14	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os06g06520	1.7	0.77	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os06g50950	2.72	3.22	GDSL - like lipase/acylhydrolase
LOC_Os03g22670		-1.36	Triacylglycerol Lipase
Lipid transport			
LOC_Os11g24070	1.36	3.27	LTPL10 - LTP family protein precursor



LOC_Os01g62980	0.52	1.03	LTPL101 - LTP family protein precursor
LOC_Os03g50960	1.11	2.41	LTPL118 - LTP family protein precursor
LOC_Os12g02320	0.56	1.51	LTPL12 - LTP family protein precursor
LOC_Os10g40430	-1.6	-0.65	LTPL139 - LTP family protein precursor
LOC_Os10g40530	-1.31	-0.08	LTPL146 - LTP family protein precursor
LOC_Os06g49190	1.76	2.12	LTPL154 - LTP family protein precursor
LOC_Os10g36070	0.44	1.06	LTPL155 - LTP family protein precursor
LOC_Os10g36100	1.71	3.36	LTPL157 - LTP family protein precursor
LOC_Os11g02330	-1.11	-0.12	LTPL22 - LTP family protein precursor
LOC_Os08g27210	1.31	0.35	LTPL3 - LTP family protein precursor
LOC_Os07g39640		-5.85	LTPL64 - LTP family protein precursor
LOC_Os11g37280	1.17	-4.96	LTPL68 - LTP family protein precursor
LOC_Os11g02369	-1.4		LTPL7 - LTP family protein precursor
LOC_Os04g38840	1.21	0.54	LTPL81 - LTP family protein precursor
LOC_Os06g49770	-1.07	-0.36	LTPL86 - LTP family protein precursor
LOC_Os03g47370		-1.12	LTPL95 - LTP family protein precursor
LOC_Os09g29660	0.2	1.9	White-brown complex homolog protein
LOC_Os03g17350	0.11	2.12	White-brown complex homolog protein
LOC_Os06g51460	1.18	0.52	White-brown complex homolog protein
		Cytoch	rome P450
LOC_Os02g09200	2.46	2.72	Cytochrome P450 71D10
LOC_Os12g02640	-0.11	-1.54	Cytochrome P450 72A1
LOC_Os03g04660	0.59	2.54	Cytochrome P450 86A1
LOC_Os06g03930		1.55	Cytochrome P450 86A1
LOC_Os06g30640	0.55	2.25	Cytochrome P450
LOC_Os03g14400	-0.42	1.16	Cytochrome P450
LOC_Os04g48210	0.27	-8.61	Cytochrome P450
LOC_Os01g10040	1.25	2.07	Cytochrome P450
LOC_Os02g26810	2.15	3.28	Cytochrome P450



表S-3 相关基因编码序列

	Supplemental table 3 Coding sequences of related genes
Gene ID	Coding sequence(5' 3')
EAT1	ATGATTGTTGGGGGCTGGTTACTTTGAGGATTCCCACGATCAAAGT
	CTCATGGCAGGATCTTTGATCCATGACTCAAATCAAGCTCCTGCA
	AGCAGTGAAAACACAAGCATTGATTTGCAGAAATTCAAAGTGC
	ACCCGTACTCAACAGAAGCTCTCTCGAATACGGCCAATCTAGCT
	GAAGCTGCAAGAGCAATTAACCACCTTCAACATCAACTAGAAAT
	TGATTTGGAGCAAGAGGTTCCCCCAGTAGAAACTGCAAACTGG
	GATCCAGCTATCTGCACTATACCAGATCATATCATCAACCATCAGT
	TTAGCGAAGATCCACAAAACATATTGGTGGAGCAACAGATCCAG
	CAGTATGATTCTGCACTTTATCCAAATGGTGTTTACACACCTGCA
	CCAGATCTCCTTAATCTTATGCAGTGCACAATGGCTCCAGCATTC
	CCGGCAACGACATCCGTATTCGGTGACACAACACTGAATGGTAC
	TAACTATTTGGATCTTAACGGTGAACTTACAGGAGTAGCAGCGG
	TTCCAGACAGTGGGAGTGGGTTGATGTTTGCTAGTGATTCAGCT
	CTCCAGTTAGGGTACCATGGTACTCAATCTCATCTAATAAAGGAT
	ATCTGCCACTCGTTGCCCCAAAATTATGGGTTGTTTCCCAGTGAG
	GACGAACGAGATGTGATTATTGGTGTTGGAAGTGGAGATCTTTT
	TCAGGAGATAGATGACAGGCAGTTTGATAGTGTACTTGAATGCA
	GGAGAGGGAAGGGTGAGTTCGGAAAGGGCAAGGGAAAAGCTA
	ATTTTGCAACTGAGAGAGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGGG
	GTTCAGGACCCTAAGAATGCTCTTCCCAAATCCTACCAAGAATG
	ACAGGGCCTCAATAGTAGGTGATGCCATTGAGTATATAGATGAGC
	TCAATCGAACAGTGAAGGAGCTGAAGATCCTGGTGGAACAGAA
	GAGGCATGGAAATAACAGGAGAAAGGTGTTAAAGTTGGATCAA
	GAGGCAGCCGCTGATGGCGAGAGCTCATCGATGAGGCCAGTGA
	GGGATGATCAAGACAATCAGCTCCATGGAGCCATAAGGAGCTCA
	TGGGTTCAGAGGAGGTCAAAGGAATGCCACGTTGATGTCCGCAT
	AGTGGACGATGAAGTAAACATCAAGCTCACTGAAAAGAAGAAG
	GCCAACTCTCTGCTTCATGCAGCAAAGGTTCTAGATGAGTTCCA
	GCTCGAGCTTATCCATGTAGTGGGTGGGATTATAGGTGATCACCA
	TATATTCATGTTCAACACTAAGGTATCAGAAGGTTCGGCGGTTTA
	TGCATGTGCAGTGGCAAAGAAGCTCCTTCAAGCAGTGGACGTG
	CAACACCAGGCCCTCGACATATTCAACTAA
TDR	ATGGGAAGAGGAGACCACCTGCTGATGAAGAACAGCAATGCTG
	CTGCAGCTGCAGCTGCTGTCAATGGAGGTGGCACCAGTTTGGAT
	GCTGCATTGAGGCCTCTAGTTGGTTCAGATGGCTGGGATTACTGC
	ATCTACTGGAGGCTCTCTCCTGATCAGAGGTTCTTGGAGATGAC
	AGGATTCTGCTGCAGCAGTGAGCTTGAAGCACAGGTCTCAGCA
	CTGCTGGACCTGCCTTCTTCAATCCCACTGGACTCCTCCATA
	GGGATGCATGCGCAGGCATTGCTGTCGAACCAGCCGATCTGGCA
	GAGCAGCAGTGAGGAGGAGGAGGCTGATGGCGGCGGTGGCGC
	CAAGACGCGGCTGCTGGTCCCCGTCGCCGGCGGCCTCGTCGAG



CTCTTCGCGTCGAGATATATGGCGGAGGAGCAGCAGATGGCGGA GCTTGTCATGGCGCAGTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGGGGACGAC GGTGGGGGGGCAGGCGTGGCCGCCGCCGGAGACGCCCAGCTTCC AGTGGGACGGAGGCGCCGACGCGCAGAGGCTGATGTACGGCGG CTCGTCGCTGAACCTGTTCGACGCCGCCGCCGCCGACGACGACC CGTTCTTGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGACGCCGTGGGCGACGAGGC GAGCCGTCGGTGGCGGTGGCGCAGGAGCAGATGCAGCACGCGG CGGGCGGCGGCGTGGCGGAGTCCGGGGGGGGGGGGGAGGAGC TGCATGGCGGTGACCCGGAGGACGACGGCGACGGCGAGGGGCG CTCCGGCGGCGCCAAGAGGCAGCAGTGCAAGAACCTCGAGGCG GAGAGGAAGCGGAGGAAGAAGCTCAATGGCCACCTCTACAAGC TCCGCTCGCTCGTCCCAAACATCACCAAGATGGATCGCGCGTCG ATTCTTGGAGACGCGATCGACTACATCGTGGGGTTGCAGAAGCA GGTGAAGGAGCTGCAGGACGAGCTGGAAGACAACCATGTCCAC CATAAGCCGCCCGACGTGCTCATCGACCACCCGCCGCCGGCGAG CCTCGTCGGGCTCGACAACGACGACGCCTCGCCGCCCAACAGC CACCAACAGCAGCCGCCGCTCGCCGTTTCCGGCAGCAGCAGCA GGAGGAGTAACAAGGACCCAGCAATGACCGACGACAAGGTCGG CGGCGGCGGCGGCGGTGGGCACCGGATGGAGCCGCAGCTGGAG GTGCGTCAGGTGCAGGGGAACGAGCTGTTCGTCCAGGTGCTCT GGGAGCACAAGCCCGGCGGGTTCGTCCGCCTCATGGACGCCAT GAACGCGCTCGGCCTCGAGGTCATCAACGTCAACGTCACCACCT ACAAGACCCTCGTCCTCAACGTCTTCCGCGTCATGGTGAGGGAC AGCGAGGTGGCGGTGCAGGCGGACAGGGTGAGGGACTCGCTGC TGGAGGTGACGCGGGAGACGTACCCCGGCGTGTGGCCGTCGCC GCAGGAGGAGGACGACGCCAAGTTCGACGGCGGCGACGGCGG CACGACGAAGTCGGCGGCGGATACCATCAGCACCTGCATTACCT CGCGTTTGATTGA LOC Os12g13930 ATGGCCTCCGCCGCATACTACGCCGGGCTCGTCGCCGGCACGCC ACCTCCGCCGTGTCGCCCTGGCCGGCTCCGGCGGTGTCAGCCGC CGGCCAATAACCTCGTCTCATCAGGTAGAAGAAGCCATCAAGCA ATTAGGGTCACCAATGGAGTGAACATGGATGGCCGGGCAAAGCT TGCAGCCCCAGTTGCAGTGGTCACTGGAGCATCTAGAGGGATTG GAAGAGCCATCGCTGTGGCTCTTGGCAAAGCAGGGTGCAAGGT GATTGTGAACTATGCCAAGTCAGGTATGGAAGCTGAAGAAGTGT GCAGAGAGATTGAGGAGTCCGGGGGGCACCGCGATCACCTTCTCT GCTGACGTCTCCATCGAAGCCGAGGTCGAATCCATGATGAGAGC CGCAATTGACACTTGGGGGAACACTAGACGTGCTGGTGAACAATG CAGGGATCACAAGAGACGCACTGCTGATGCGGATGAAGCGGAC ACAGTGGCAGGAGGTCGTCGACGTCAACCTCACCGGCGTCTAC AGGGAAGGATCATCAACATCACCTCGGTTTCCGGGATCATCGGC



	AACATTGGGCAGGCCAACTACTGCGCTGCCAAGGCCGGGGTGA
	TCGGTCTGACCAAAGCCATGGCCAGGGAGTACGGCAGCAGAAA
	CATCAATGTGAACGCCGTTGCTCCTGGCTGGGTGACCTCCAACA
	TGACCGCAAAACTAGGCGACAATGTCGAACAGAAGGCTCTCGA
	GACGATACCGTTAGGACGGTTTGGCAAACCAGAAGAGATAGCC
	GGTCTGGTGGAGTTCCTGGCCGTCCATCCTGCTGCAAGCTACAT
	CACTGGGCAGGTGCTGCCGGTTGATGGTGGCCTGTCAATTTGA
LOC_Os11g32650	ATGGCGGCGGCGGTGACGGTGGAGGAGGTGAGGAGGGCGCAG
	AGGGCGGAGGGGCCGGCGACGGTGCTGGCGATCGGGACGGCG
	ACGCCGGCGAACTGCGTGTACCAGGCCGACTACCCGGACTACTA
	CTTCAGGATCACCAAGAGCGAGCACATGGTCGAGCTCAAGGAG
	AAGTTCAAGAGGATGTGTGACAAGTCGCAGATCAGGAAGAGGT
	ACATGCACCTGACGGAGGAGATCCTGCAGGAGAACCCCAACAT
	GTGCGCGTACATGGCGCCGTCGCTGGACGCGCGGCAGGACATC
	GTCGTCGTCGAGGTCCCCAAGCTGGGGAAGGCGGCGGCGCAGA
	AGGCGATCAAGGAGTGGGGGGGGGCAGCCGCGCTCCCGCATCACCCA
	CCTCGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCGGCGCCG
	ACTACCAGCTCGCCAAGATGCTCGGCCTGAGGCCCAACGTGAA
	CCGCCTCATGATGTACCAGCAGGGGTGCTTCGCCGGCGGCACGG
	TGCTCCGCGTCGCCAAGGACCTCGCCGAGAACAACCGCGGCGC
	GCGCGTCCTCGCCGTGTGCTCCGAGATCACGGCGGTGACGTTCC
	GGGGGCCCTCCGAGTCCCACCTCGACTCCATGGTCGGGCAGGC
	GCTGTTCGGCGACGGCGCGGCGGCGGTGATCGTCGGCTCCGAC
	CCCGACGAGGCCGTCGAGCGGCCGCTGTTCCAGATGGTGTCGG
	CGAGCCAGACCATCCTCCCGGACAGCGAGGGCGCCATCGACGG
	CCACCTGAGGGAGGTCGGGCTGACGTTCCACCTGCTCAAGGAC
	GTGCCGGGGCTCATCTCGAAGAACATCGAGCGCGCGCTGGGCG
	ACGCGTTCACACCGCTGGGGATCTCGGACTGGAACTCCATCTTC
	TGGGTGGCGCACCCCGGAGGTCCGGCGATCCTGGACCAGGTGG
	AGGCGAAGGTTGGGCTGGACAAGGAGAGGATGAGGGCGACGC
	GCCACGTGCTGTCCGAGTACGGCAACATGTCGAGCGCCTGCGTG
	CTCTTCATCCTCGACGAGATGCGCAAGCGCTCCGCCGAGGACGG
	CCACGCCACCGGCGAGGGCATGGACTGGGGCGTCCTCTTC
	GGCTTCGGCCCCGGCCTCACCGTTGAGACCGTCGTCCTCCACAG
	CGTCCCCATCACCGCCGGCGCCGCCGCCTGA
LOC_Os03g25010	ATGGCTTCTTCTAGGTCGTCCATCTCCCTCTCCTCGCCGACGATG
	ATTCCTGTACTATTTCTTCTCTGCGCGCACTCCGCCACCGCCGCT
	GCCAACTCCGGTGGTGGTGGTCACCTGGCGACCGGCGCCGGCG
	GTGACGACGGCTTCAGCTGCTTCACGCGCATGTTCAGCTTCGGC
	GACTCCATCACCGACACGGGTAACTCCGCGACGATCAGCCCCA
	ACGCTTCTTTCAACAGACTCCCCTACGGCGAGACCTTCTTCGGC
	CGCCCACCGGCCGCTACAGCGACGGCAGGCTCATCGTCGACT
	TCCTAGCGGAGCTGGGGGCTGCCGTTCTTGACGCCGTTCCTCCGC
	GGGCGGGAGACGGTGGCGGCGGAGGACTTCCGGCATGGGGCG



	AACTTCGCGGTGGGTGGAGCGACGGCGCTGAGGCGGGAGTTCT
	TCGAGGAGATGGGGCTTGACCTCACCAACATACCGCCATACTC
	GCTGGACGTGCAGGTGGAATGGTTCAAGAGCGTGCTCCACTCG
	CTTGCCTCCGCAGACAAAGAACGCAAGAAAATCATGTCTAAAT
	CAATTTTTATAATGGGGGGAGATTGGAGGAAACGACTACAATCA
	GCCTTTCTTCCAAAACCAATCCTTCATCAATGAGATCAAGCCAT
	TGGTACCAAAAGTTATATCGAAGATTGAGAACGCTATCAAGGT
	CCTAATCGACCTAGGAGCCAAGACGATTATTGTTCCAGGAAATT
	TTCCTATAGGGTGTGTTCCAGGTTATCTCGGGATATTTCCAAAC
	AAGTTAAGTCCTAAAGACTACGATGTGTTTGGCTGCATAAAGTG
	GTTGAATGACTTCTCCAAGTACCACAACCATGCGCTCAAGCGCA
	TGATGCATCGGATCCCTCACGATCCTACAATCACCATACTCTAC
	GTCGACTACTACAATACCGCTTTAGAGATCACCCGTCACCCTGC
	CATACATGGGTTCAAGAGGGAGACTGTGTTTGTGGCATGCTAC
	AAGGGTGGCAACTCGTAG
LOC_Os03g19670	ATGGTGTTGATTCGTCTTACTATGCTGATCTTTATCGCCATCCTC
	CTTGCCGGCCGCACATGCGTACTTGTTGTTGCCGGCGGTGGAAT
	GCCGGCAACCTTCGTGTTCGGTGACTCGCTCGTCGACGCCGGCA
	ACAACAACTATCTCGTCTCCCTGTCCAAGGCAAACTACCCACCA
	AACGGCATCGACTTCGACGGACACCAGCCCACCGGCCGGTACA
	CCAACGGCCGCACCATCGTGGATATACTAGGGCAGGAAATGTC
	GGGAGGATTTGTGCCGCCCTACCTGGCGCCGGAGACCGCCGGC
	GACGTCCTGCTTAAGGGCGTCAACTACGCGTCCGGCGGCGGAG
	GCATTCTGAACCAAACCGGGAGCATCTTCGGTGGGCGCATCAA
	TCTGGACGCCCAGATCGACAACTACGCCAACAACCGGCACGAG
	CTGATCAAGCGGCACGGGGGGGGGTGGGCGGTGACCCTGCTCC
	GTGGCGCGCTCTTCTCGGTCACGATGGGATCCAACGATTTCATC
	AACAACTACCTCACCCCAATCTTCGGCGTGCCGGAGCGCGCCGT
	GACGCCACCGGAGGTCTTCGTCGACGCCCTCATATCCAAATACC
	GGGAGCAGCTCATAAGGCTGTACCTGCTGGACGCCCGTAAGAT
	CGTGGTGGCGAACGTTGGGCCGATCGGGTGCATCCCGTACCTG
	AGGGACACGACGCCGACGGTCGGAACGGCGTGCGCCGAGTTCC
	CTAACCAGCTTGCCCGCAACTTCAACCGCAAGCTGCGCGGCCTG
	GTGGACGAGCTGAGCGCCAACCTCACCGGCTCCCGCTTCCTCTA
	CGCCGACGTCTACCGCGTCTTCTCCGACATCATCGCCAACTACA
	AGTCGCACGGGTTCGAGGTGGCGGACTCGGCGTGCTGCTACGT
	GAGCGGGAGGTTCGGCGGGGTTGCTGCCGTGCGGGCCGACGTCG
	CAGTACTGCGCGGACAGGTCCAAGTACGTGTTCTGGGACCCGT
	ACCACCCAAGCGACGCCGCGAACGCGCTCATCGCCCGCCGGAT
	CATCGACGGCGAGCCGGCGGACATCTTCCCGATCAACGTGCGC
	CAGCTGATCACGAGCTGA
LOC_Os07g39640	ATGGCGCGGCACACGTGGGTCATCTCCTTGCTCCTCACCTCCGC
(LTPL64)	CGTGGCTGGTGCGTCGCGGCAGCCGCCGCGACCGCAAGCCAA
	GGACCGACATGGACCGGCCTTGCCGGAGAGCAAGAAATGGAA



GGAGCAGCCACCGCTTCATCCGCAGCGCCGGTGGCTTCGCTGTT CCCCGGCCTCCCGCCATTGCCGCCGCTGCCAGCGCTCCCCGCT TGCCGCCGCTTCCACCGCTGCCGCCGCTGCCACCG TTGCCGCCATTGCCGCCGCTCCCTTCACCCGGGACGACGACGAC GCGGCCGCGGCCACCATCGCCACCGCCGACGGAGTGCCTGACG TCGCTCGTGGAGCTGCTGCCGTGCGTCGACTACCTCACCAACGA CGCCACCGCGCCGCCGGGCGCCTGCTGCGACGGATTCAGGTCG CTCGTTGGCAGCGCGCTCATCTGCCTCTGCCACGGCATCAATGG CGACATGAGCAGGATGATCTCCAGGCCCATCGATCCGGTCCGCC ATGGTGCTCCTTCCCGCCATGTGCAGCACCATGCTGCCGCCGCA GTCGCTTTCATATGCTACACGGAAACAGTGCCACCATTGGTGC CATAG



Start (0)	LOC_0s12g13930 RNAi					<b>End</b> (2912)
	500	1000'	1500	2000'	2500	
+1	300	498	81 - 195 - 46 101 - 95	<b>—</b> 175 <b>—</b> <u>88</u> <b>—</b> 327 <b>—</b>	135 117 94 85	2912
		1095			2500	
Start (0)	LOC_0s11g32650 RANi	격식, 격식, 월달, 전막 전막 모				End (2852)
	5001	1000	1500	2000	2500	
+1		1055			1010	2052
166			and the second second		2174	
Start (0)	LOC_0s03g25010 RNAi					End (3104)
		1000'	1705	2000	- 154 h 110 - 077	3000
+1	124 2260		1723		136 119 277	3104
1 121						
Start (U)	LOC_0s03g19670 RNAi					End (1966)
-		5001	1000	150		
+1	>114	128	2411		- 117 - 2	1966
			1033			1050
Start (0)	LOC 0s07g39640 RNAi					<b>End</b> (783)
		2001	4001	6	001	
+1		586			168	20 783
	107					769

图S-1 相关基因RNA干扰靶标 Supplemental fig 1 RNAi targets of related genes



表S-4 相关基因启动子序列

Supplemental table 4 Promoter sequences of related genes			
Gene ID	Coding sequence(5' 3')		
LOC_Os11g37280	CAGTAAAACCAACCACCTATAGTGTCATAGGACCTAATTTAGTCC		
(OsC6)	AGTTTCGTAAGTTGGGGGTTAGGATTTTAGTATTGTGTGTAGGGAT		
	ATGATATTTAAACTTGATGGAAAGATGAGGAACCTTAAGTATACT		
	TATTACGATTATCAACGATGAGTCGGCCCTTGGATTAGGTGTTCTA		
	TTTTTTGGTTTTTGTGTTGAGAATAATATGGTTGGGTTTTCACGTT		
	GGACACATCTGGGCTTTGAGGTTAAGGTTGCAATTTCGAGTAGG		
	AAGTTGAAGCATTTTCTGAGTTGAAAAGTCAAGTTTGCAATTTT		
	GAGTAGAAACGCGAATCATTTGATTCATTTCCGAGTTGAAAAGT		
	TGAGATTGACAATCTCAAAGTTCAAAGTGAATTCTTTTTTACA		
	CAGTTCAAAGTGAATTTTGGTTAAAAACCCTCAGGTTGTATTTGGA		
	TAATGGGAAATATGTGGTGGAATTGGGAATGGGAAATGAACGAA		
	GGGTTAGGATTAAATGGAAGAAGGAGAATAAATGGTTAAAATTT		
	AAAGATGTCTTTTAGTGGGTGGGAAATGATTTCCCTTTCCCATTA		
	GCCAAACGGGGCCTCAGTATATTTTCAATTAACAGAAGTTTAATA		
	CTTAATAATTTAAATGACAGTTCAATATTTTAGCCATGACACATGG		
	CATCCAATGAAAGGGTCGTCCACTAGAAATAAAGGTGACAGACG		
	ATCACTGAATAGGTACACCCATACCAGCCACCTTTCTATTGTCTTT		
	GCACTTGGATTGAAAAGTGGTCACAAGGGTTAAAAACCCTGAATC		
	ATTCGGAAATGTTTTTGCCACACAAATGAGTTCCAAATACACTG		
	AGTGACACTACGGGTCAGTCACTAAAATTTCTGAAATGTTGTTA		
	CCTACTCGTCTCTTTGTCCAAAAATAAACCAAACTCGTACGGTGT		
	GAATATATCTTCAATGTTACCTACACTGTACAAGGTTAGCTTATTT		
	TGTAACGGAGGGAACATACATCTTTCGATAACATTATAATTGTTG		
	TGCCGCCTTGGTTCAGTTCAAATTTCTTTTTACAAAATTCCGCTT		
	GCATCTTTGTCCCGGCGCGGCAAAAAAAAAAAACCACAATAAAGG		
	TATCATATAAAAACAATGATGGCAGTTAATCAGTTTAGGTTGGTC		
	ACTATCTTAATAGATGCAAATTAAGTTGGGTTGTAGCGAAACCAA		
	CGAACGGCATTTGTTTTGTGCTCCCACGATACAATCCCTTAAATC		
	AGCACACACGCACAATGCATGCACCACATTTTAGATCGATTTCGT		
	AGAGAATATTTCGATCACATAGCCACAATTAATCTACATTCTAGA		
	AGCTCCAACAAACTTATTTAATTAGTTCCTGCAAATTAACATTTA		
	CAAATATCTCAAACTGAAGAAATAACTTTAATTGCAATGCCGGCA		
	GCCAACCCGGCGTGTATGCTTCCATTTGTTCGATGTAAAGTGCTG		
	TTTATCCATAGGAAGAGATGTAATATTAATAACTACTCCATCCGTT		
	TCTAAATATTTGACGTCATTGACTTTTTTTAAATATGTTTGAATGT		
	TCGTCTTATTTAAAAAAATTTAAGTAATTATTAATTATTTTTCTATC		
	ATTIGATITATIGTIAAATATACTTATATGTATACATATAGTTTTACA		
	TATTICACAAAAGTTTTTGAATATGACGAAAGGTTAAACATGTGC		
	TAAAAAGTCAATGGTATCAAATATTTAGAAACGGAGGAGTATG		
	TTTGTTGAAAATGTTTTACCTTCTCTCAATCTTAATAAATTTGGTC		
	AGGGCAGGCACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		



	AAACAAAAACAGTGGAAATTAAGCATTGCTAATTACAAACTTTT
	CTGATCATTCACACCATTTTCATGTTTGATCCAGCTCAAACTTCA
	CTACAACAGCTTAGAACACTCTTAGCTAGCAAAAGTCCTAATCA
	CAGCCATTATAAATAGACACAAGCAATTAGCCTCATCTACACACA
	CTCCCATCACTCCAATTAACCAAAGCTAATTAAGCTAGCT
	TCTAATCCACATTTAGCTAGA
LOC_Os04g48210	TTTGCTGGGGATCATGGCGTGTGTATCGCTCCGACGCATGCTGCG
	TTCATGCGGGAGCCCTTTCCGTTTTCTTAGGGAGTGCGTGC
	TGCGTGTTTCCGATCGTGGGGATGGCGCGGTCTACTCGGGAGGCA
	TGGCGAAGTGGCGGGGAGGGTAGGAACGCATGGCGGCAACTTCG
	GTCGTGGGATGACGTGATCCAGTAGAGAGTTGTGGACATGTAAT
	TTGCTATTTAAAGTTTCCTAATGCAACTAAAAACGCTGCAAGTTT
	TTTCGCAGCACAAACATCATCTTCTCGCTCGCTCTGTTTTGATCG
	GTATTTCGTCGAACACCTGCGGGAGTTCGCCAACAGTACCTGAC
	CACGCTACGCGGGTGATCCTTCCGGCCTCCGCAATCAGCAGACG
	AGCGAAGCAGCAGCTCGTCCATGCGGATTGGGGGGGGGG
	CGCCGGGTTTGCCTTCCCAGTTGTGCCACGGAAACCCGGAGAG
	AGCAAAGGATTTCGTAGGCCGTGTGACGATGGGCATTGTGCGGA
	TTTTGGGAAGCCGAAATCTCTGTAGATGGGCCAGAATCTTAAGA
	TCTAACGGGAAGGATCAGGCCGGCCCATCCTAGTAGCAGCAGCC
	ATCGAACATTCGATCCACCAACAACGACAGGCTGAGCAACCACT
	AGTTTTTCACAACCTTTACGTTGATGGCTTCACCAAACCACGGT
	CAAAGCCGTGACCCCCCCCCCTCTACTCCTTACATACCGATCGTC
	CTACAGCCAAATGTGCTTTGCTTTCGACGACGGCACATGTAGATC
	AACAGAAGCAGATACTGCCACTAGCGCATATTACACGCGTGCAG
LOC Os07g39640	CATGGGCAGCCGCTCGTTCCGTGCCGCGTGCAAATCCCGTGCCG
	TTGCCCTGATGACGGGTCGGCCCCACAAGATTACTTGGCGGGTT
	GGACCATGTCAAAGTGCCACGCCAGCGAAACTGCGTTCTAAAA
	CAGTTAAGGAAGACAAATTACACCGGTTTTAATAGATTAGGAG
	CCAAGGTATCCGGTATTACGGTTTAGTGATAGGAATCAAATTAG
	AGTCAAAGTGAACTTGCATAGCAATGTGTGGGGCTGCTAGGCAG
	ATCGGGCACAGACAGAACACTGCCCAAGAAATGTTCTAACGAA
	TTTCAGGCAACACGTGCGAAACAAACCATGATTCTAAGTAGCTT
	ATGAAAGTATGGCTTGTCTTCTAAAAGTACAGTTTCTCTAAAAA
	CTTCCTACATCAGCATCCATTAGATAAAACTTTTTCCAAATTAC
	TTGTCAGGGAATGTATCCTATGCACACAGTTCTTATCTATAAT
	CTATCCAACCATCCAGTTAGAACACACCCCTAATAATCCATAGTA
	CTCGAGAGTTTGAGACTATGAGGTACTACTGAGTTTGTCGGTTC
	AGAGATTCTGGTACCCCAAGGCTTAATCTTCTGGCGTAACAATG
	TGAAGGATAAACAAGTGGGTGATTTTGTGATGCATTCTGTATTC
	AGAAGAGACCATGCCAAGTGCCAAGAACGTGAAGCTACCAACT
	AAGTCCCAGGAATGTTCCGTCACAACAAGTGAGTATAAAAAGTC
	ΑCTTCGGTTAAGATCAAGCATGGCGACCAAGAGCATGATCCCG
	AAGCCAAGAGAGTAGAACGGGATTAAATTCACCTTTTACGGTC



TCGCACAATGCAGAGAAGATC



# THE COOPERATION OF TDR & EAT1 IN REGULATING THE POLLEN EXINE DEVELOPMENT OF RICE

As the population grows, the global demand for food will dramatically increase. Rice is one of the world's three major staple food and feeds more than one third of the whole population. How to increase the grain yield of rice is becoming an urgent problem. Despite the Genetic Modification (GM) technology, the traditional hybrid method is still playing a critical role. The research on the mechanisms of male sterile in rice is an important topic. A better knowledge of the mechanisms will lead to better cultivation of fine varieties of rice. In order to understand how pollen exine develops in rice, we used microarray, SEM, TEM, dual-luciferase reporter assay, RNAi and other biochemical and genetic methods to explore the roles of ETERNAL TAPETUM 1 (EAT1) and TAPETUM DEGENERATION RETARDATION (TDR) in tapetum and pollen exine development.

Tapetum is the inner cell layer of the anther and is close to microspores. Its appropriate differentiation, development, metabolism and nutrient transport as well as programmed cell death (PCD) play key roles in the development of microspores, especially in the pollen exine morphogenesis. Previous studies have shown that the pollen exine development is regulated by the cooperation between tapetum and microspores. Microspores first form a primexine template on the surface, which determines the deposition and assemly pattern of pollen exine procursors. Tapetal cells then release these procursors (sporopollenin, tryphines, etc.) and necessary nutrients required for pollen development through polar transportation or PCD<sup>[10, 60, 61]</sup>. However, the molecular mechanism underlying pollen exine formation is still unclear.

Our lab has isolated a male sterile mutant-*eat1*, from a rice mutant population that were generated by <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray treatment of an *O. sativa ssp japonica cultivar*, 9522<sup>[46]</sup>. EAT1, an important bHLH transcription factor, is essential to the development of tapetum and microspores. Its malfunction will cause a delayed programmed cell death in tapetal cells and finally result in aborted pollen development<sup>[44]</sup>. Besides, we found that *eat1* also exhibited other phenotypic abnormalities:

- (1) The ubisch bodies of *eat1* are round-shaped, in contrast to the quadrate ubisch bodies observed in wild-type strain. Its density on the inner surface of tapetum is much lower than wild-type.
- (2) The baculum layer of exine is missing in *eat1*, showing a lack of low electron density layer between tectum and nexine.
- (3) There is lots of abnormal lipidic accumulation in tapetal cell locules and the junction between tapetum and middle layer.

In order to illuminate how EAT1 contributes to the pollen exine development, we carried out transcriptome analysis of *eat1* and wild-type anthers at stage 9 and stage 10 by microarray. A total



of 1192 genes were found differentially expressed between wild-type and *eat1* anthers, among which, 613 genes were down-regulated in *eat1* anthers (there were 163 genes down-regulated at stage 9, 416 genes down-regulated at stage 10 and 34 genes down-regulated both at stage 9 and stage 10). By Gene Ontology (GO) categorization analysis, we found 15% of the down-regulated genes were involved in lipid metabolism and lipid transportation. The spatial-temporal expression pattern of these down-regulated genes was analyzed and compared with that of EAT1. According to other data, including qRT-PCR, EMSA and ChIP-PCR collected by Niu Ningning<sup>[56]</sup>, we selected LOC\_Os03g25010, LOC\_Os03g19670, LOC\_Os07g39640 (LTPL64), LOC\_Os11g32650 and LOC\_Os12g13930 as the down-stream candidate genes for EAT1 and proceeded to RNAi mutants construction of these genes.

During the phenotypic observations of these RNAi lines in the fields, we found that the fertility of *LTPL64-RNAi* lines decreased significantly. The anthers of *LTPL64-RNAi* lines were much smaller than wild-type but similiar to *eat1* anthers. We further focused on characterizing the 8 *LTPL64-RNAi* lines validated by genotyping. The qRT-PCR results confirmed the down-regulation of LTPL64 in these lines at stage 9 and stage 10, idicating that the RNAi costruction was working. *In situ* hybridization results of wild-type anthers at stage 9 and stage 10 demonstrated that LTPL64 was specifically expressed in the tapetum and microspores. We chose *LTPL64-RNAi* 9 line and implemented SEM and TEM to better charaterize the phenotypes. To our surprise, the tapetum and microspores of *LTPL64-RNAi* 9 were similiar to those of *eat1*. The ubisch bodies of *LTPL64-RNAi* 9 were round-shaped, in contrast to the quadrate ubisch bodies in wild-type but consistent with the phenotype observed in *eat1*. What's more, the baculum layer of exine was also missing in *LTPL64-RNAi* 9, showing a lack of low electron density layer between tectum and nexine.

TDR is another important bHLH transcription factor, which plays critical role during tapetum and microspores development. In order to find out how EAT1 and TDR together regulates tapetum and microspores development, a comparison between microarray data of *eat1* and *tdr* anthers at stage 9 and stage 10 was performed. Results illustrated an unexpected overlapping among the down-regulated genes of *eat1* and *tdr*. There were 613 genes down-regulated in *eat1* and 1161 genes down-regulated in *tdr*. 210 of them were both down-regulated in *eat1* and *tdr*. It was worthy of mention that LOC\_Os07g39640 (LTPL64) and LTPL68/OsC6 were the only two Lipid Transfer Proteins (LTPs) family genes that were both down-regulated in these two mutants, while LOC\_Os04g48210 was the only one CYP gene both down-regulate their down-stream tragets, It is reported that the interaction between EAT1 and TDR do exist<sup>[44, 58, 59]</sup>. We hypothesized LOC\_Os07g39640 (LTPL64), LTPL68/OsC6 and LOC\_Os04g48210 to be candidate down-stream genes of EAT1 or TDR. Dual-luiferase reporter assay was performed to determine how EAT1 and TDR coopoerate to regulate their expression. Two regulation mechanisms are illustrated by the results:

(1) The regulation of LOC\_Os07g39640 (LTPL64) and LOC\_Os04g48210 promoter: The transcription activity of LOC\_Os07g39640 (LTPL64) and LOC\_Os04g48210 promoter were up-regulated by 1.7 and 1.3 folds respectively in the presence of EAT1, while in the presence of TDR, the transcription activity were up-regulated by 1.5 and 1.3 folds



respectively. In the presence of both EAT1 and TDR, the up-regulations reached to 2.6 and 2.1 folds, respectively.

(2) The regulation of LTPL68/OsC6 promoter: In the presence of EAT1, the transcription activity was up-regulated by 4.2 folds by TDR; while, the transcription activity was up-regulated 1.6 folds. However, when EAT1 and TDR co-existed, the activity increased dramatically to 33.8 folds.

We inferred that the expression of LOC\_Os07g39640 (LTPL64) and LOC\_Os04g48210 are regulated by TDR/TDR or EAT1/EAT1 homodimer but not by TDR/EAT1 heterodimer, while LTPL68/OsC6 is maily regulated by TDR/EAT1 heterodimer, may also be regulated by TDR/TDR or EAT1/EAT1 homodimer

Besides TDR and EAT1, there is another bHLH transcription factor-TDR INTERACTING PROTEIN 2 (TIP2) also regulates the development of microspores. The expression of these three bHLH transcription factors in anthers was chronological. TIP2 is the first one to be transcripted, TDR then followed. The TIP2 and TDR form heterodimer to activate the expression of EAT1<sup>[44, 58, 59]</sup>. We inferred that these three bHLH transcription factors co-regulate the development of tapetum: 1) TIP2 controlled the tapetum differentiation and may activate the expression of TDR. 2) TDR and TIP2 formed heterodimer to activate the expression of EAT1 can substitute TIP2 to form heterodimer with TDR. 4) TDR/TDR homodimer, EAT1/EAT1 homodimer and TDR/EAT1 heterodimer play key roles in regulating the development of tapetum, nutrient metabolism and transport as well as programmed cell death.

All these evidence can demonstrate that the cooperation between EAT1 and TDR in influencing the ubisch bodies and pollen exine development in rice, which might be directly through regulating LTPL64, LTPL68/OsC6 and other lipid metabolic genes by different dimerization patterns(TDR/TDR homodimer, EAT1/EAT1 homodimer and TDR/EAT1 heterodimer).

In summary, this study preliminarily explained the roles that EAT1 and TDR played during tapetum and pollen exine development, which is only a tip of the iceberg of complicated cooperarion network among different transcription factors. It is of significant importance not only in the basic research area to better understand the molecular mechanisms of reproductive development, but also in the applied research to facilitate breeding with the aim to increase the grain yield of rice.