

宋露,唐佳琦,田晓杰,等. *UDTI/TDR* 基因过表达对水稻育性的影响[J]. 土壤与作物,2022,11(2):150 – 158.

SONG L,TANG J Q,TIAN X J,et al. Effects of *UDTI/TDR* gene overexpression on rice fertility[J]. Soils and Crops,2022,11(2):150 – 158.

UDTI/TDR 基因过表达对水稻育性的影响

宋露^{1,2}, 唐佳琦^{1,2}, 田晓杰¹, 卜庆云¹

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150081; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 研究水稻颖花的育性机理对于水稻生产具有重要意义。*UDTI* 和 *TDR* 基因编码参与水稻花药绒毡层发育的 bHLH 转录因子, 其功能缺陷会导致雄性不育, 本研究的主要目的是分析 *UDTI/TDR* 过表达在花药发育中的作用。构建了 *UDTI/TDR* 的过表达载体, 利用农杆菌介导方法转化粳稻品种“龙粳 11”, 对 T_1 代转基因植株进行 I_2 – KI 染色、花药形态观察及结实率统计, 明确了其表型。qRT – PCR 技术检测获得 4 个 *UDTI* – *OE* 株系和 3 个 *TDR* – *OE* 株系, *UDTI/TDR* 基因过表达植株的可育花粉粒显著下降, 花药发育不正常, 结实率显著下降。*UDTI/TDR* 过表达会影响水稻花药的发育, 降低可育花粉比例从而造成雄性不育。本研究进一步揭示了 *UDTI/TDR* 对水稻育性的影响, 为解析雄性不育分子机理提供理论支撑。

关键词: 水稻; *UDTI*; *TDR*; 绒毡层; 花药; 结实率

中图分类号: S511 文献标识码: A 文章编号: 2095 – 2961 (2022) 02 – 150 – 09

Effects of *UDTI/TDR* gene overexpression on rice fertility

SONG Lu^{1,2}, TANG Jiaqi^{1,2}, TIAN Xiaojie¹, BU Qingyun¹

(1. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: It is of great significance to study the fertility mechanism of rice spikelet for rice production. *UDTI* and *TDR* genes encode bHLH transcription factors that are involved in the development of rice anther tapetum, and their functional defects lead to male sterility. The main aim of this study was to analyze the effect of *UDTI/TDR* gene overexpression in anther development. *UDTI/TDR* over – expression vectors were constructed, and overexpression transgenic plants in the variety " LJ11 " background were obtained by agrobacterium – mediated transformation. The T_1 generation of transgenic plants were used for phenotype analysis, including anther morphology, pollen fertility and seed setting rates. Four *UDTI* – *OE* lines and three *TDR* – *OE* lines were identified by qRT – PCR assay and used for further analysis. The results showed that the amount of fertile pollen grains of *UDTI/TDR* – *OE* plants significantly decreased, the anther development was abnormal, and the seed setting rate significantly declined as well. We conclude that *UDTI/TDR* over – expression affects the development of rice anthers, decreased the proportion of fertile pollen and led to male sterility. This study further provides more evidence and supports the critical roles of *UDTI/TDR* in rice fertility.

Key words: *UDTI*; *TDR*; tapetum; anther; seed setting rate

0 引 言

水稻是重要的粮食作物, 世界上半以上人口都以其为主食。而水稻的产量与育性密切相关, 其雄性生殖器官正常的形态结构和发育是水稻繁衍过程的关键保障^[1]。水稻雄性不育 (MS, male sterility) 是雄性器官发育异常, 花粉不具有受精活力, 但雌性器官发育和功能均正常的现象^[2]。

在水稻雄性生殖器官花药的结构中, 花药壁由外到内分别由表皮层、药室内壁、中层和绒毡层这 4 层

收稿日期: 2022 – 01 – 20; 修回日期: 2022 – 02 – 10.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (JQ2020C003); 国家自然科学基金委黑龙江省地方联合基金 (U20A2025); 中国科学院青年创新促进会项目 (2021229) .

第一作者简介: 宋露 (1996 –), 女, 在读硕士, 研究方向为水稻分子育种. E – mail: songlu19@ mails. ucas. ac. cn.

通信作者: 卜庆云 (1976 –), 男, 研究员, 研究方向为水稻分子育种. E – mail: buqingyun@ iga. ac. cn.

不同的细胞组成。绒毡层位于花药壁的最内层, 直接与小孢子接触, 绒毡层的正常发育能保障花粉母细胞减数分裂周期正常完成, 在发育后期它分泌胼胝质降解酶来分解胼胝质, 使小孢子释放出来, 并为花粉粒的进一步成熟提供营养, 绒毡层细胞向雄配子体运输物资的直接通道是乌氏体^[3]。绒毡层的发育是一个连续的过程, 主要分为2个阶段: 分化形成^[4]和退化降解^[5]。绒毡层在小孢子母细胞形成期初步形成, 由次级壁细胞经过两次分裂后形成于花药壁的最内层^[4]; 从小孢子母细胞减数分裂初期至小孢子早期, 绒毡层细胞质颜色开始逐渐加深, 并出现细胞凋亡信号, 在小孢子中期绒毡层开始退化降解, 最终在成熟花粉期完全消失^[5]。调控绒毡层发育的基因大多编码转录因子, 通过直接或间接调控绒毡层的分化形成或退化降解, 进而使绒毡层的生理功能出现异常, 最终导致小孢子发育受阻, 引起雄性不育。因此, 解析相关转录因子的功能是了解水稻绒毡层发育调控的重要部分。

研究发现, bHLH (basic helix – loop – helix) 转录因子是调控水稻绒毡层发育过程中重要的转录因子^[6]。其中, bHLH 类转录因子 *UDT1* (*UNDEVELOPED TAPETUM 1*) 是调控水稻绒毡层早期发育的关键基因, 它参与次生壁细胞向成熟绒毡层的分化过程。在减数分裂前, 突变体 *udt1-1* 的花药壁和小孢子母细胞发育相对正常, 但减数分裂期绒毡层异常空泡化, 小孢子不能生成, 绒毡层细胞降解延迟, 最终导致无花粉型雄性不育, 且无法结出可育籽粒^[7]。另一编码 bHLH 转录因子的 *TDR* (*TAPETUM DEGENERATION RETARDATION*) 通过正向触发绒毡层细胞程序性死亡 (Programmed cell death, PCD) 来调控水稻绒毡层的发育和降解, 突变体 *tdr* 表现为绒毡层和中层 PCD 滞后以及花粉壁的缺陷, 进而导致雄性完全不育^[9]。*UDT1* 和 *TDR* 都通过调控绒毡层标记基因 (*OsC4*、*OsC6* 和 *OsCPI1*) 的表达来调节绒毡层的发育和降解, 这些基因在 *udt1* 和 *tdr* 突变体中显著下调^[8-9]。*EAT1* (*ETERNAL TAPETUM 1*) 同样是 bHLH 类转录因子, *EAT1* 可以在转录水平调控天冬氨酸蛋白酶 (Aspartic protease, ASP) 的表达, 并可与 *TDR* 相互作用, 作用于 *TDR* 的下游。*eat1-1* 突变体的绒毡层细胞增厚, 乌氏体形状不规则, 花药发育和小孢子形成过程异常终止, 造成雄性不育^[10]。编码 bHLH 类转录因子的 *TIP2* (*TDR INTERACTING PROTEIN 2*) 的突变体 *tip2* 影响了花药的早期发育, 其花药壁内药室内壁、中层、绒毡层三层细胞不能正常分化形成, 后期中层和绒毡层 PCD 中断, 导致小孢子母细胞发育停滞, 造成雄性完全不育^[11-12]。这些研究结果表明, bHLH 类转录因子影响水稻绒毡层的发育, 对水稻花粉的育性产生了很大的影响。除编码 bHLH 类转录因子的基因外, 参与水稻花药绒毡层发育调控的基因还有 *OsGAMYB*^[13-14]、*PTC1* (*PERSISTENT TAPETAL CELL 1*)^[15]、*DTC1* (*DEFECTIVE TAPETUM CELL DEATH 1*)^[16]、*API5* (*APOPTOSIS INHIBITOR 5*)^[17]、*EDT1* (*EARLIER DEGRADED TAPETUM 1*)^[18]、*MTR1* (*MICROSPORE AND TAPETUM REGULATOR 1*)^[19]、*TIP3* (*TDR INTERACTING PROTEIN 3*)^[20]、*BM1* (*BAYMAX1*)^[21]、*OsMADS3*^[22]、*OsMADS8*^[23]、*OsAGO2*^[24]、*OsALDH2b*^[25] 等。

前人研究已经表明了 *UDT1/TDR* 功能的缺失会严重影响绒毡层的发育进而影响水稻的育性^[7-9], 然而, *UDT1/TDR* 过表达植株是否会影响水稻的育性目前尚不清楚, 为了进一步分析 *UDT1/TDR* 基因对水稻育性的影响, 本研究利用植物基因过表达技术, 分别对水稻 *UDT1* 和 *TDR* 基因进行过量表达, 通过对获得的过量表达转基因株系进行表型观察, 明确了 *UDT1* 和 *TDR* 的过表达会导致水稻育性降低, 丰富了 *UDT1/TDR* 对水稻育性的调控机理, 也为水稻高产、稳产育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和菌株

本研究以粳稻“龙粳11”为实验材料, 获得过表达转基因材料。植株在哈尔滨 (北纬45°) 的室外,

以 25 cm × 25 cm 的植物间距种植于盆栽盒，自然长日照条件下生长。实验所用大肠杆菌（*Escherichia coli*）菌株 *TOP10*，农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）菌株 *EHA105* 和植物载体 *PC1390U* 均由中国科学院东北地理与农业生态研究所水稻分子育种实验室保存。

1.2 *UDT1/TDR* 基因的过表达载体构建

利用超纯总 RNA 提取试剂盒（杭州新景生物试剂开发有限公司）提取龙粳 11 幼穗的 RNA，反转录成 cDNA（逆转录试剂盒，Takara 公司）作为 PCR 扩增模板。在 Rice Genome Annotation Project 网站（<http://rice.uga.edu/>）下载 *UDT1*（LOC_ Os07g36460）、*TDR*（LOC_ Os02g02820）的基因序列并通过 Primer 5 设计引物序列。采用引物 *UDT1 - CDS - F* 和 *UDT1 - CDS - R*（表 1）扩增 *UDT1* 基因的编码区（coding sequence, CDS）序列；采用引物 *TDR - CDS - F* 和 *TDR - CDS - R*（表 1）扩增 *TDR* 基因的 CDS 序列，PCR 扩增产物与经 *BamHI* 和 *KpnI* 酶切的 *PC1390U* 载体片段连接构建载体，转化大肠杆菌菌株 *TOP10*，挑取单菌落于 37 ℃，160 r·min⁻¹ 振荡培养 12 h 后，利用快速质粒 DNA 小量试剂盒（杭州新景生物试剂开发有限公司）提取质粒，将酶切鉴定正确的质粒送交吉林库美生物有限公司测序，测序验证无误的即为成功构建的过表达载体。

表 1 本研究中所用的引物
Table 1 Primers used in this research

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）
UDT1 - CDS - F	GTTACTTCTGCACTAGGTACCATGCCGCGCGCGGAGGGC
UDT1 - CDS - R	TCTTAGAATTCCCGGGGATCCGATGCTTGGAACCTCCACAA
TDR - CDS - F	GTTACTTCTGCACTAGGTACCATGGAAGAGGAGACCACCT
TDR - CDS - R	TCTTAGAATTCCCGGGGATCCATCAAACGCGAGGTAATGCA
HPT - F	TGCGCCCAAGCTGCATCAT
HPT - R	TGAACTCACC GCGACGCTCTGT
UDT1 - QRT - F	GGCTCAACGGCAACATCTTCGC
UDT1 - QRT - R	AGGCTCCTCAGCTCCACCATCA
TDR - QRT - F	CGCTCGCTCGTCCCAAACAT
TDR - QRT - R	CGGTCATIGCTGGGTCTTGT
ACTIN - QRT - F	AGACCTTCAACACCCCTGCTATG
ACTIN - QRT - R	TCACGCCCAGCAAGGTCTG

1.3 农杆菌介导的水稻遗传转化

将构建的 *UDT1*、*TDR* 过表达载体转化农杆菌 *EHA105*，并利用农杆菌介导法对野生型龙粳 11 水稻愈伤组织进行遗传转化，经过浓度为 60 mg·L⁻¹ 的潮霉素（Hygromycin, Hyg）筛选抗性愈伤组织，分化获得 T₀代过表达转基因植株。

1.4 转基因植株分子生物学检测

将 T₀代转基因植株种植于室外盆栽盒中，对每株 T₀代植株提取叶片的全基因组 DNA，通过潮霉素基因特异引物 HPT（表 1）进行 PCR 检测，产物大小为 900 bp 的植株为阳性转基因植株，种植并收获种子用于下一代种植。将 T₀代收获的种子室温浸种 1 d，37 ℃催芽 2 d，育秧后种植于室外盆栽盒中，在苗期提取 T₁代植株叶片基因组 DNA，继续利用引物 HPT 鉴定，选择鉴定为阳性的株系用于后续试验。

1.5 T₁ 代转基因植株 UDTI/TDR 基因转录水平表达检测

为了检测目的基因 UDTI 和 TDR 在野生型和过表达材料 UDTI - OE/TDR - OE 中的表达量，提取对照材料龙梗 11 和过表达转基因植株 UDTI - OE/TDR - OE 的 RNA，逆转录成 cDNA，采用实时荧光定量 PCR（quantitative real - time PCR，qRT - PCR）检测目的基因表达量。实验设置 3 次技术重复。

1.6 转基因植株表型分析

颖花观察：水稻抽穗后开花前 1 d，去掉小穗的颖壳，在显微镜（奥林巴斯 SZX16）下观察雄蕊和雌蕊的颜色和形态。

花粉染色观察：水稻抽穗后开花前 1 d，将样品固定在甲醛 - 乙酸 - 乙醇（FAA）溶液中，进行 1% I₂ - KI（1% I₂，8% KI，W/V）染色镜检，取穗部上中下各 3 个小穗进行观察。镜检时，打开颖壳，小心剥离出花药，置于载玻片上，滴加 20 μL 的 I₂ - KI 滴剂，用镊子捣碎花药，释放出花粉粒，于显微镜（奥林巴斯 BX53）下观察花粉粒的活力。

成熟期穗部观察：成熟期观察水稻穗部的结实情况并统计结实率。

2 结果与分析

2.1 UDTI/TDR 基因的过表达载体构建

采用 PC1390U 载体作为 UDTI 和 TDR 植物过量表达载体，该载体含有潮霉素植物选择标记基因，以组成型启动子 CaMV35S 驱动目的基因表达（图 1A）。采用基因特异引物 PCR（表 1）分别扩增获得长度为 704 bp（UDTI）和 1659 bp（TDR）的目的条带，PCR 产物与经 BamHI 和 KpnI 酶切的 PC1390U 载体片段连接，对重组质粒进行酶切检测，获得预期大小目的片段（图 1B），表明目的片段已成功连入 PC1390U 空载体中。将构建成功的重组质粒进行测序验证后，转化到农杆菌 EHA105 中，用于后续的转基因实验。

2.2 水稻遗传转化及抗性植株分子生物学检测

采用农杆菌介导法转化野生型龙梗 11，获得潮霉素阳性转基因 T₀代 UDTI - OE 植株 15 株，TDR - OE 植株 17 株，对其中收获到种子的 4 个阳性 UDTI 株系和 3 个阳性 TDR 过表达株系继续繁殖进行实验（图 1C），对 4 个阳性 UDTI 和 3 个阳性 TDR 过表达株系种植的 T₁代共 90 株进行潮霉素鉴定，其中阳性共 76 株，选择以上 T₁代阳性的植株进行后续的实验。

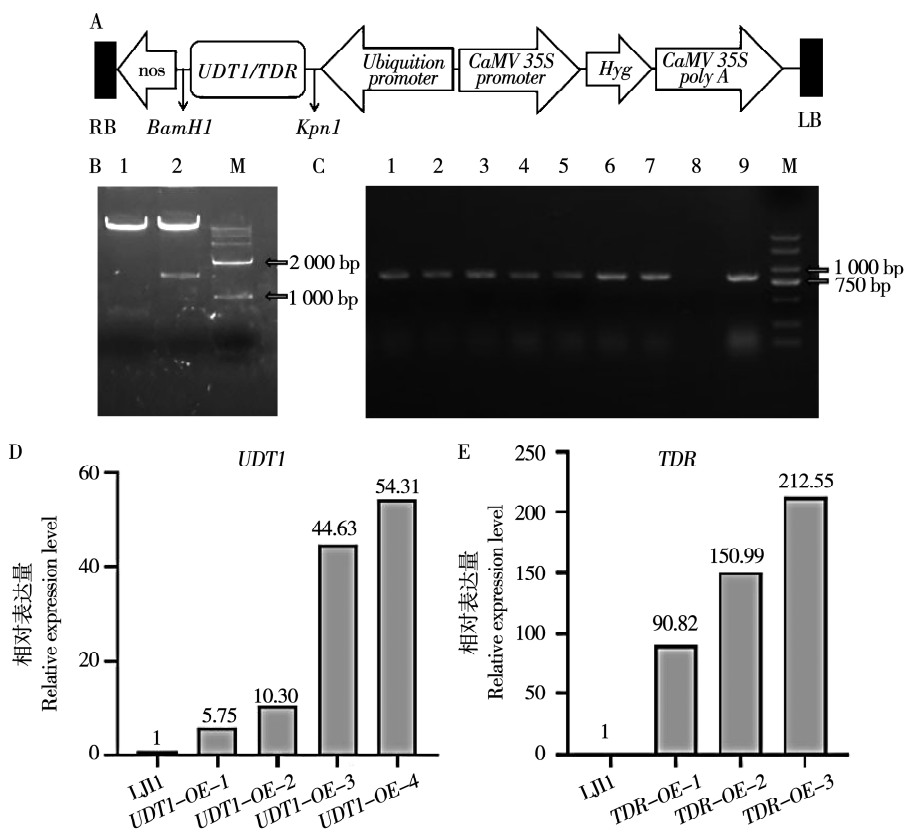
2.3 转基因植株 UDTI/TDR 基因转录水平表达检测

利用 qRT - PCR 方法检测野生型龙梗 11 和 UDTI - OE/TDR - OE 阳性过表达转基因株系 T₁代体内相应基因的表达水平，发现四个阳性 UDTI 过表达株系 UDTI - OE - 1、UDTI - OE - 2、UDTI - OE - 3、UDTI - OE - 4 体内 UDTI 表达水平均有不同程度的提高，分别提高了约 6、10、44、54 倍（图 1D）；三个阳性 TDR 过表达株系 TDR - OE - 1、TDR - OE - 2、TDR - OE - 3 体内 TDR 表达水平均有不同程度的提高（图 1E），分别提高了约 90、150、210 倍。

2.4 UDTI、TDR 过表达转基因植株表型特征

2.4.1 UDTI、TDR 过表达转基因植株结实统计。观察 UDTI - OE 不同株系的结实率情况，发现 UDTI 过表达转基因植株结实率均有不同程度的降低。其中 UDTI - OE - 1、UDTI - OE - 2 结实率显著下降，分别为 67.63%、63.54%，而 UDTI - OE - 3、UDTI - OE - 4 结实率几乎为 0（图 2A，B）。

观察 TDR - OE 不同株系的结实率情况，发现 TDR - OE - 1、TDR - OE - 2、TDR - OE - 3 结实率均几乎为 0（图 2C，D）。因此，过表达 UDTI、TDR 会导致结实率的显著下降。



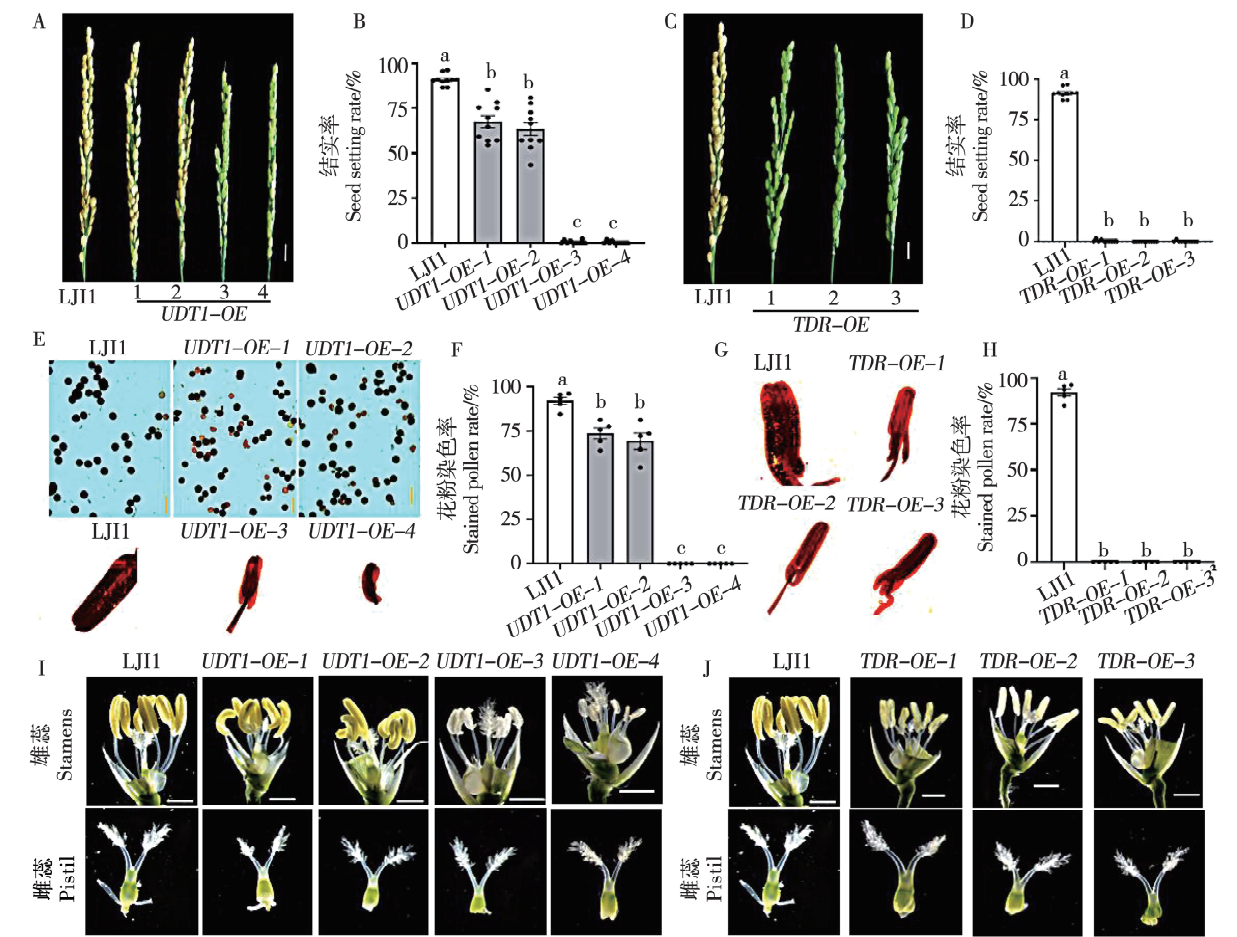
注：A：过表达重组载体 *PCI390U-UDT1/TDR* 示意图。LB 为 DNA 左边界，*Hyg* 为潮霉素抗性基因，*CaMV 35S promoter* 为花椰菜病毒 35S 启动子，RB 为 DNA 右边界；B：重组载体的双酶切鉴定（*BamHI* 和 *KpnI*）。1 代表 *1390U-UDT1* 阳性单克隆，2 代表 *1390U-TDR* 阳性单克隆，M 为 DNA 标记；C：*T*₀ 代植株转基因检测。1-4 代表 *T*₀ 代 *UDT1-OE* 阳性植株，5-7 代表 *T*₀ 代 *TDR-OE* 阳性植株，8 为阴性对照，9 为阳性对照，M 为 DNA 标记；D-E：*T*₁ 代表转基因阳性植株转录表达检测。*LJ11* 为野生型，*UDT1-OE-1* ~ *UDT1-OE-4* 为 4 个 *UDT1* 过表达转基因植株，*TDR-OE-1* ~ *TDR-OE-3* 为 3 个 *TDR* 过表达转基因植株。

Note: A, Schematic diagram of overexpression vector of *PCI390U-UDT1/TDR*. LB, left border of DNA, *Hyg*, Hygromycin, *CaMV 35S promoter*, Cauliflower mosaic virus 35S promoter, RB, right border of DNA; B, confirmation of recombinant plasmid by double enzyme digestion (*BamHI* and *KpnI*). 1, positive independent clone of recombinant plasmid *1390U-UDT1*; 2, positive independent clone of recombinant plasmid *1390U-TDR*, M, DNA Marker; C, transgenic detection of *T*₀ generation plants. 1-4, positive *T*₀ generation plants of *UDT1-OE*; 5-7, positive *T*₀ generation plants of *TDR-OE*; 8, negative control; 9, positive control; M, DNA marker; D-E, expression analysis of *T*₁ transgenic positive plants. *LJ11*, wild type, *UDT1-OE-1* to *UDT1-OE-4*, four independent *UDT1* overexpression transgenic plants; *TDR-OE-1* to *TDR-OE-3*, three independent *TDR* overexpression transgenic plants.

图 1 过表达 *UDT1/TDR* 转基因水稻的鉴定

Fig. 1 Identification of transgenic rice overexpressing *UDT1/TDR*

2.4.2 *UDT1*、*TDR* 过表达转基因植株花粉活力统计。*I*₂-KI 染色实验结果表明，野生型花药中充满饱满的深蓝色可育花粉，4 个 *UDT1* 过表达 *UDT1-OE* 株系中，过表达倍数较低的 *UDT1-OE-1*、*UDT1-OE-2* 可育花粉粒比例显著下降，分别为 73.6%、69.3%（图 2E，F），而 *UDT1* 过表达倍数较高的 *UDT1-OE-3*、*UDT1-OE-4* 花药中无花粉粒释放（图 2E，F），进而观察了其整个花药的染色情况，发现野生型花药中充满了深蓝色的可育花粉粒，而在 *UDT1-OE-3*、*UDT1-OE-4* 花药中观察不到任何花粉粒（图 2E）。



注：A - D，过表达转基因株系与野生型成熟穗部表型（A，C）及结实率（B，D）。标尺为 1 cm，数据显示为平均值 ± 标准误（n = 10），统计学显著性差异用不同的小写字母表示（ $P < 0.05$ ，采用 Tukey 显著性差异检验的单因素方差分析）。E - H，过表达转基因株系与野生型的花粉育性（E，G）和花粉染色率（F，H）。（E，G），LJ11、UDT1 - OE、TDR - OE 的花粉或花药 I₂ - KI 染色，标尺为 20 μm，数据显示为平均值 ± 标准误（n = 5），统计学显著性差异用不同的小写字母表示（ $P < 0.05$ ，采用 Tukey 显著性差异检验的单因素方差分析）。I - J，过表达转基因株系与野生型的颖花表型。上排图片为雄蕊表型，下排图片为雌蕊表型，标尺为 1 mm。

Note: A - D, images of panicles (A, C) and seed setting rate (B, D) of overexpression transgenic plants and wild type. The scale bar is 1 cm, and data are shown as means ± SE (n = 10). Statistically significant differences are indicated by different lowercase letters ($P < 0.05$, one - way ANOVA with Tukey's significant difference test). E - H, pollen fertility (E, G) and stained pollen ratio (F, H) of overexpression transgenic plants and wild type. (E, G), pollen or anther KI - I₂ staining of LJ11, UDT1 - OE, TDR - OE, and the scale bar is 20 μm. Data are shown as means ± SE (n = 5). Statistically significant differences are indicated by different lowercase letters ($P < 0.05$, one - way ANOVA with Tukey's significant difference test. I - J, images of spikelet of overexpression transgenic plants and wild type. The upper row of pictures is the stamen phenotype, the lower row of pictures is the pistil phenotype, and the scale bar is 1 mm.

图 2 过表达 UDT1/TDR 转基因水稻表型分析

Fig. 2 Phenotypic analysis of transgenic rice overexpressing UDT1/TDR

观察 TDR - OE 不同株系的 KI - I₂ 染色情况，发现 3 个 TDR 过表达株系中均无花粉粒释放（图 2G，H），随后观察了其整个花药的染色情况，发现野生型花药中充满了深蓝色的可育花粉粒，而在 TDR - OE - 1、TDR - OE - 2、TDR - OE - 3 花药中均观察不到任何花粉粒（图 2G）。UDT1、TDR 的过表达会严重影响花粉活力进而影响水稻结实率。

2.4.3 *UDTI*、*TDR* 过表达转基因植株花药形态。在开花前 1d 取野生型及过表达株系 *UDTI* - *OE* 颖花, 剥开内外颖壳, 在解剖镜下进行花药形态特征观察。野生型花药饱满, 直立于花丝上, 长度较长, 呈现为黄色 (图 2I); *UDTI* 过表达转基因植株花药形态有不同程度的变化, 其中 *UDTI* - *OE* - 1、*UDTI* - *OE* - 2 表现出明显的花药卷曲且变短, 但颜色与野生型无明显差别 (图 2I), 而 *UDTI* 基因表达量较高的 *UDTI* - *OE* - 3、*UDTI* - *OE* - 4 花药表现出严重的颜色发白, 长度变短, 皱缩卷曲, 呈半透明的丝状 (图 2I)。而 *UDTI* - *OE* 雌蕊的表型与 LJ11 无区别 (图 2I), 说明 *UDTI* 只对雄性生殖器官有影响。

同时观察过表达株系 *TDR* - *OE* 颖花, 剥开内外颖壳, 在解剖镜下进行花药形态特征观察。发现 *TDR* 过表达转基因植株花药颜色变浅, 长度变短, 表面皱缩, 花药形态明显变差 (图 2J)。综上所述, 过表达 *UDTI*、*TDR* 会对水稻花药的生长发育造成严重影响。

3 结论与讨论

本研究通过构建 *UDTI* 和 *TDR* 基因过量表达载体, 以黑龙江优质粳稻品种龙粳 11 为背景材料, 获得了 *UDTI* - *OE* 及 *TDR* - *OE* 过量表达转基因水稻, 通过 I_2 - KI 染色、花药形态观察及结实率统计明确了 *UDTI* 和 *TDR* 的过表达对水稻育性的影响。

水稻绒毡层的分化形成和退化降解是一个复杂的过程。根据前人对花粉产生过程的划分, 将水稻花粉产生过程的时间节点分为小孢子母细胞形成期、小孢子母细胞减数分裂期、小孢子发育早期、小孢子发育中期、小孢子发育晚期、二胞花粉发育早期、二胞花粉发育晚期、成熟花粉发育期 8 个时期。在小孢子母细胞形成期, 花药壁四层细胞分化形成; 在小孢子母细胞减数分裂期, 绒毡层的胞质开始形成浓缩状态; 小孢子发育早期, 绒毡层胞质呈完全浓缩状态; 随着小孢子的逐渐发育, 绒毡层逐渐变为带状, 其小孢子发育晚期呈瓦状; 在二胞花粉发育早期, 小孢子经过有丝分裂形成了生殖细胞和营养细胞, 此时期的绒毡层仅余下残留组织; 在成熟花粉发育期, 淀粉粒等贮藏物完全充满了整个花粉粒, 绒毡层完全退化消失, 仅余下次生绒毡层壁^[26-27]。绒毡层细胞的分化发育对小孢子的正常发育至关重要, 且在小孢子和花粉发育后期, 绒毡层细胞必须适时降解以便为小孢子提供充足的营养物质, 促进小孢子和花粉粒的成熟, 保证成熟花粉的释放。绒毡层的降解是一个细胞程序性死亡 PCD 的过程, PCD 过程的提前或延迟都会造成雄性不育^[5]。小麦中 *RAFTINI* 基因的提前高表达会导致绒毡层 PCD 异常而提前降解, 小孢子无法得到充足的发育所需营养而造成雄性不育^[28]。水稻中 *OsGAMYB* 主要在花药原基和绒毡层细胞中表达, 其突变体表现为小孢子发育早期绒毡层细胞开始异常肥大, PCD 过程被抑制, 小孢子解体, 导致花粉不育^[13-14]。

绒毡层细胞适时 PCD 是小孢子正常发育的重要保障^[3]。*UDTI* 主要参与次生壁细胞向成熟绒毡层的分化, 处于减数分裂期的 *udt1* 绒毡层不能正常降解并呈空泡化, 小孢子发育过程受阻、花粉囊内无法产生花粉细胞, 从而影响花粉活力^[7]。*tdr* 突变体主要表现为绒毡层细胞质表现出染色不加深, 不浓缩等 PCD 异常的超微结构特征, 且 TUNEL 试验和彗星试验结果表明, *tdr* 绒毡层 PCD 信号微弱, 说明其未能降解; 对小孢子发育阶段的 *tdr* 突变体花药进行转录分析时, 发现编码半胱氨酸蛋白酶的 *OsCPI* 和编码半胱氨酸蛋白酶抑制剂的 *OsC6*, 而半胱氨酸蛋白酶与细胞凋亡密切相关, 表明 *TDR* 与水稻花药绒毡层的 PCD 过程密切相关^[9]。绒毡层细胞的 PCD 对于其发育及降解过程十分重要, PCD 过程的提前或延迟发生都会造成雄性不育^[5]。前人的研究已经揭示了 *UDTI*、*TDR* 的功能缺失会引起花药绒毡层 PCD 的异常, 从而导致雄性不育。而我们发现 *UDTI*、*TDR* 过量表达也能导致雄性不育的表型, 这可能是由于 *UDTI*、*TDR* 在水稻

花药中的表达是一个十分精细的过程，过高或过低的表达量都会对花药育性造成影响，UDT1、TDR 的过表达植株绒毡层细胞 PCD 可能提前发生，从而导致了不育的表型。因此我们推测，UDT1、TDR 亦可能是通过影响绒毡层 PCD 的适时发生来影响育性的。

本研究进一步揭示了 UDT1、TDR 在水稻中的功能，即 UDT1 或 TDR 过量表达植株花药发育受损，长度变短，颜色发白，质地变差，进而影响了可育花粉比例，导致了结实率的显著下降，甚至出现不育的表型。在 UDT1-OE 的 4 个株系中，雄性不育表型的严重程度随着 UDT1 表达量的提高而增大（图 1D，1E，2A，2B，2E，2F，2I），三个 TDR-OE 表达倍数均在 90 以上，均表现出不结实、无花粉等雄性完全不育表型（图 1D，1E，2C，2D，2G，2H，2J）。综上所述，UDT1、TDR 在水稻雄性生殖发育中起着不可或缺的作用，本研究对丰富花粉发育新机制和创制新类型不育种质资源具有重要意义。

参考文献（References）：

[1] 邹德洪, 邹小云, 贺浩华. 水稻细胞质雄性不育分子生物学研究进展 [J]. 种子, 2006, 25 (10): 32-37.
ZOU D H, ZOU X Y, HE H H. Research progress in molecular biology of rice cytoplasmic male sterility [J]. Seed, 2006, 25 (10): 32-37.

[2] 朱英国. 水稻雄性不育生物学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000.
ZHU Y G. Biology of male sterility in rice [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2000.

[3] SCOTT R J. Stamen structure and function [J]. The Plant Cell, 2004, 16 (S1): S46-S60.

[4] 陈睿, 李清贤, 杨绍华. 水稻花粉发育相关基因的研究进展 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (3): 274-280.
CHEN R, LI Q X, YANG S H. Research advances on rice genes related to pollen development [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2010, 25 (3): 274-280.

[5] 马龙, 徐薇, 窦玲玲, 等. 水稻花粉育性相关基因研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47 (10): 42-47.
MA L, XU W, DOU L L, et al. Research progress on pollen fertility-related genes in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47 (10): 42-47.

[6] LIN H, YU J, PEARCE S P, et al. Rice anther net: a gene co-expression network for identifying anther and pollen development genes [J]. The Plant Journal, 2017, 92 (6): 1076-1091.

[7] JUNG K H, HAN M J, LEE Y S, et al. Rice *Undeveloped Tapetum1* is a major regulator of early tapetum development [J]. The Plant Cell, 2005, 17 (10): 2705-2722.

[8] 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.

[9] LI N, ZHANG D S, LIU H S, et al. Therice tapetum degeneration tapetum degradation and anther development [J]. The Retardation Gene is Required for Plant Cell, 2006, 18 (11): 2999-3014.

[10] NIU N N, LIANG W Q, YANG X J, et al. *EAT1* promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice [J]. Nature Communications, 2013, 4: 1445.

[11] FU Z Z, YU J, CHENG X W, 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): 1512-1524.

[12] RANJAN R, KHURANA R, MALIK N, et al. *bHLH142* regulates various metabolic pathway-related genes to affect pollen development and anther dehiscence in rice [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43397.

[13] LIU Z H, BAO W J, LIANG W Q, et al. Identification of *gamyb-4* and analysis of the regulatory role of *GAMYB* in rice anther development [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52 (7): 670-678.

[14] 杨正福, 张迎信, 孙廉平, 等. 水稻雄性不育突变体 *gamyb5* 的鉴定与基因定位 [J]. 中国水稻科学, 2016, 30 (2): 143-151.

YANG Z F, ZHANG Y X, SUN L P, et al. Identification and gene mapping of male sterile mutant *gamyb5* in rice [J]. China Rice Science, 2016, 30 (2): 143 – 151.

[15] LI H, YUAN Z, VIZCAY – BARRENA G, et al. *PERSISTENT TAPETAL CELL1* encodes a PHD – finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice [J]. Plant Physiology, 2011, 156 (2): 615 – 630.

[16] YI J, MOON S, LEE Y S, et al. *Defectivetapetum cell death 1 (DTC1)* regulates ROS levels by binding to metallothionein during tapetum degeneration [J]. Plant Physiology, 2015, 170 (3): 1611 – 1623.

[17] LI X W, GAO X Q, WEI Y, et al. Rice *APOPTOSIS INHIBITOR5* coupled with two DEAD – box adenosine 5' – triphosphate – dependent RNA helicases regulates tapetum degeneration [J]. The Plant Cell, 2011, 23 (4): 1416 – 1434.

[18] BAI W T, WANG P R, HONG J, et al. *Earlier degraded Tapetum 1 (EDT1)* encodes an ATP – citrate lyase required for tapetum programmed cell death [J]. Plant Physiology, 2019, 181 (3): 1223 – 1238.

[19] TAN H X, LIANG W Q, HU J P, et al. MTR1 encodes a secretoryfasciclin glycoprotein required for male reproductive development in rice [J]. Developmental Cell, 2012, 22 (6): 1127 – 1137.

[20] YANG Z F, SUN L P, ZHANG P P, et al. *TDR INTERACTING PROTEIN 3*, encoding a PHD – finger transcription factor, regulates Ubisch bodies and pollen wall formation in rice [J]. The Plant Journal, 2019, 99 (5): 844 – 861.

[21] XIANG X J, SUN L P, YU P, et al. The MYB transcription factor *Baymax1* plays a critical role in rice male fertility [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2021, 134 (2): 453 – 471.

[22] HU L F, LIANG W Q, YIN C S, et al. Rice *MADS3* regulates ROS homeostasis during late anther development [J]. The Plant Cell, 2011, 23 (2): 515 – 533.

[23] CHEN Z S, LIU X F, WANG D H, et al. Transcription factor *OsTGA10* is a target of the MADS protein OsMADS8 and is required fortapetum development [J]. Plant Physiology, 2017, 176 (1): 819 – 835.

[24] ZHENG S Y, LI J, MA L, et al. *OsAGO2* controls ROS production and the initiation of tapetal PCD by epigenetically regulating *OsHXX1* expression in rice anthers [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116 (15): 7549 – 7558.

[25] XIE X R, ZHANG Z X, ZHAO Z, et al. The mitochondrial aldehyde dehydrogenase OsALDH2b negatively regulatestapetum degeneration in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71 (9): 2551 – 2560.

[26] 冯九焕, 卢永根, 刘向东, 等. 水稻花粉发育过程及其分期 [J]. 中国水稻科学, 2001, 15 (1): 21 – 28.

FENG J H, LU Y G, LIU X D, et al. Pollen development and its stages in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2001, 15 (1): 21 – 28.

[27] 卢永根, 冯九焕, 刘向东, 等. 水稻花粉及花药壁发育的超微结构研究 [J]. 中国水稻科学, 2002, 16 (1): 29 – 37.

LU Y G, FENG J H, LIU X D, et al. Ultrastructural studies on the developmental process of pollen and anther in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2002, 16 (1): 29 – 37.

[28] 盛英, 张改生, 李亚鑫, 等. 小麦生理型雄性不育花药绒毡层和孢粉素变化与 RAFTIN1 表达的关系 [J]. 中国农业科学, 2011, 44 (19): 3937 – 3944.

SHENG Y, ZHANG G S, LI Y X, et al. The relationship on anther tapetum, sporopollenin and expression of RAFTIN1 in physiological male sterile wheat [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44 (19): 3937 – 3944.