



蒯佳雨,李金红,冯湘池,等. *AtFLA22* 基因对拟南芥育性的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2023(8):1-7.

# *AtFLA22* 基因对拟南芥育性的影响

蒯佳雨,李金红,冯湘池,周铭辉,王 宁,陈一飞,李美娜

(广州大学 生命科学学院,广东 广州 510006)

**摘要:**成束状阿拉伯半乳糖蛋白(Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins, FLAs)广泛存在于植物中,参与调控植物多个生长发育阶段。相关研究的转录组数据表明 *AtFLA22* 在拟南芥绒毡层中特异表达,推测其功能可能与花粉发育有关。为探究 *AtFLA22* 功能,通过 eFP Browser 数据库基因组织表达数据绘制热图,并通过 qRT-PCR 实验进一步确认 *AtFLA22* 在花中特异表达,推测 *AtFLA22* 参与雄性育性调控。为进一步探究 *AtFLA22* 基因功能,利用 CRISPR/Cas9 技术创制了 *atfla22* 基因敲除突变体,其目标基因第 108 位碱基插入腺嘌呤 A 可能导致了蛋白翻译提前终止,对育性表型进行观察,发现该突变体果荚变短,种子出现败育表型。因此,从遗传上揭示 *AtFLA22* 参与了拟南芥雄性育性调控。

**关键词:**拟南芥;成束状阿拉伯半乳糖蛋白;雄性育性

成束状阿拉伯半乳糖( Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins, FLAs)是具有 FAS (Fasciclin) 结构域的 AGPs (Arabinogalactan Proteins) 蛋白<sup>[1-2]</sup>。多数 FLAs 在 N 端具有长约 25 个氨基酸的信号肽,有的在 C 端具有一个糖基磷酸肌醇锚(Glycosylphosphatidylinositol anchor, GPI)<sup>[3]</sup>。具有 FAS 结构域蛋白主要分布在细胞外空间,其 FAS 结构域与细胞粘附功能有关。研究表明 FLAs 广泛存在于各种生物中,在植物中参与调控根、茎和花粉小孢子发育<sup>[4]</sup>。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtFLA1* 在早期的侧根发育和芽发育过程中发挥作用, *AtFLA18* 调控了根的伸展<sup>[5-6]</sup>。茎秆中特异表达的 *AtFLA11* 和 *AtFLA12* 分别调控了次生细胞壁的发育和纤维素的合成,二者过表达均增强了植株茎秆抵抗机械压力的能力<sup>[7]</sup>。 *AtFLA16* 同样在茎中高表达,其突变体茎秆缩短<sup>[8]</sup>。 *AtFLA3* 和 *AtFLA14* 参与花粉小孢子发育,二者均定位于细胞膜,异位表达均会影响小孢子正常功能<sup>[9-10]</sup>。在水稻 EMS 库中分离到一个雄性不育突变体,通过图位克隆发现突变位点编码 *OsFLA1*, 在 *osfla1* 突变体中,观察到乌氏体异常以及小孢子外壁内层不连续,最终导致花粉败育<sup>[11-12]</sup>。水

稻中 *MTR1* (*Microspore and Tapetum Regulator 1*) 调控雄性生殖器官发育,其含有 2 个 FAS 结构域,同时也可能作为一个重要的信号分子介导生殖细胞和营养细胞间通讯<sup>[13]</sup>。陆地棉(*Gossypium hirsutum*) *ghfla19* 突变体花丝缩短、花药干瘪<sup>[14]</sup>。芜菁(*Brassica rapa*) *BrFLA2*、*BrFLA28* 和 *BrFLA32* 对花粉后期发育有重要影响, *BrFLA2/28/32-RNAi* 转基因株系在高湿度环境下花粉管提前萌发<sup>[15]</sup>。前人通过对拟南芥减数分裂过程的转录组研究,富集到一个差异表达基因 *At5g16920*, 该基因在绒毡层表达,后续通过生物信息学比对并命名为 *AtFLA22*<sup>[2,16]</sup>。

本文利用 eFP Browser 数据库转录组数据及 qRT-PCR 分析实验对 *AtFLA22* 基因的表达模式进行了分析,明确了其在花中特异基本表达的时期。进一步通过基因敲除实验对 *AtFLA22* 基因进行了敲除,并对 *atfla22* 纯合突变的表型进行了分析,发现突变体不仅花粉粒明显减少,同时种子结实率显著降低,该结果表明 *AtFLA22* 基因参与拟南芥雄性育性的调控过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究使用的拟南芥生态型 Col-0 为本课题组保存的。

1.1.2 载体及菌株 试验所使用的大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$  和农杆菌 GV3101 分别采购于深圳康体生命科技有限公司和上海唯地生物技术有限公司。用于拟南芥基因敲除的 sgRNA 中间载体 pCBC-DT1DT2 和表达载体 pHEE401E 由本实验室保存。

收稿日期:2023-04-04

基金项目:国家自然科学基金(32072084)。

第一作者:蒯佳雨(1998—),男,硕士研究生,从事大豆研究。

E-mail:1922540569@qq.com。

通信作者:李美娜(1977—),女,博士,教授,从事大豆杂种优势利用和生物钟与环境互作研究。E-mail:limeina@gzhu.edu.cn。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥种子消毒及种植条件 取适量拟南芥种子置于 1.5 mL 离心管,用 70%乙醇浸泡 30 s,快速离心后弃上清。加入现配 SSS 溶液 1 mL,于旋转摇床清洗 15 min,弃消毒液,在超净台中使用灭菌水清洗 3~4 次去除乙醇。使用 1%琼脂将种子重悬,并将种子均匀铺在 1/2 MS 培养基上。用透气胶密封后外包锡箔纸,倒置于 4℃冰箱中黑暗处理 3 d,完成春化。然后将其置于 22℃恒温植物培养箱,光照 16 h/黑暗 8 h,温度 23℃,待 14 d 后移植至种植土中继续培养。幼苗生长于人工气候室,生长条件为光照 16 h/黑暗 8 h,温度 25℃。

种子灭菌液 SSS(Seed Sterilization Solution): 5 mL 漂渍液、5 mL 纯水、2 μL 0.02% Triton X-100(现配现用)。

1.2.2 拟南芥亚历山大红染色 花苞浸于卡诺氏固定液 2 h,纯水清洗,加入亚历山大红染色液,65℃染色 30 min。染色结束后剥离花药,制片镜检。

卡诺氏固定液为无水乙醇:冰醋酸=3:1的比例,混匀混液。

1.2.3 qRT-PCR 实验步骤 使用康为世纪(RNA pure Plant Kit,CWBIO)RNA 提取试剂盒提取拟南芥相应组织样品的 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳和吸光度检测分析 RNA 质量和浓度。使用 TaKaRa 的反转录试剂盒将 1 μg RNA 反转录为 cDNA。利用 NCBI primer-blast 网站设计特异的 *AtFLA22* 定量引物(表 1)。利用普通 PCR 检测引物特异性。最后使用 Roche 荧光定

量试剂 LightCycler 480 SYBR Green I Master 进行定量 PCR。

1.2.4 拟南芥 *atfla22* 突变体创制 在 phytozome 下载 *AtFLA22* 基因序列,并将其导入 CRISPR-GE 网站,以靶序列脱靶低、特异性高等作为靶序列选择标准,靶点序列长为 20 bp。以 sgRNA 中间载体 pCBC-DT1T2 为模板,DT1-BsF/DT2-BsR (20 μmol·L<sup>-1</sup>)和 DT1-F0/DT2-R0(1 μmol·L<sup>-1</sup>)为靶点引物,高保真酶 KOD 进行 PCR 扩增,PCR 产物长度 626 bp。胶回收扩增产物。取纯化的 PCR 产物 30 ng,pHEE401E 质粒 80 ng,限制性内切酶 *Bsa* I 1.0 μL,Cutsmart 1.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 加至 13.4 μL。37℃反应 10 min。再加入 T4 DNA Ligase 0.2 μL,10×T4 DNA Ligase Buffer 1.5 μL,扩展程序为 5 cycles(37℃ 5 min、10℃ 5 min、20℃ 5 min)。转化 DH5α、鉴定阳性菌株,PCR 鉴定引物为 U626-IDF 和 U629-IDR,产物大小为 726 bp。转化农杆菌 GV3101,稳转拟南芥植株。取转基因拟南芥植株叶片提取 DNA,利用 U626-IDF/U629-IDR 进行骨架鉴定。若有骨架,再利用靶点检测引物 U626-IDF 进行测序,鉴定出突变材料。最终筛选出无 Cas9 骨架的纯合突变体植株。

花苞侵染液:MS 2.2 g,蔗糖 50.0 g,MES 0.5 g,调节 pH 至 5.7,加入 Silweet-77 200 μL,纯水定容与 1 L(现配现用)。

1.2.5 拟南芥角果长度及种子结实率统计 野生型和突变体材料种植于同一 8×4 格盆中,当植株角果发育成熟后,选取植株从上往下数的第 10 个果荚进行角果长度及种子结实率的分析。

表 1 本研究中所用引物及用途

引物名称	引物序列(5'~3')	用途
AT5G1-DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGATGATGACTAACATGCAGAGTT	拟南芥靶点引物
AT5G1-DT1-F0	TGATGATGACTAACATGCAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	
AT5G1-1DT2-R0	AACCATGTGCCTAACAACCATGAAATCTCTTAGTCGACTCTAC	
AT5G1-1DT2-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACCATGTGCCTAACAACCATGA	
U626-IDF	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC	Cas9 骨架鉴定
U629-IDR	AGCCCTCTTCTTTCGATCCATCAAC	
AT5G1gF	AACACACGCATGTCCAAAGC	拟南芥 T1/T2 靶点检测
AT5G1gR	AGCAAGAACTCGGTAACCGAATC	
qRT-1692-F	GTCAGCAGTCCGATTAGCCA	qRT-PCR 引物
qRT-1692-R	CACATGCCGATCAAACCTCGC	
ACT7-F	TGGCCGATGGTGAGGATATT	
ACT7-R	AACGGCCTGAATGGCAACAT	

1.2.6 生物信息学分析 绘制热图的数据来源于 eFP Browser 数据库,在 TAIR 上查找相应 *FLA* 基因,通过 TAIR 转到 eFP Browser,下载组织表达数据,若无表达则设置为 0。将整理后的 22 个 *FLA* 基因数据导入 Tbtools 绘制热图并进行双向标准化。

绘制系统发育树和结构域的数据来自 Phytozome。在 Phytozome 下载 22 个 *FLA* 氨基酸序列,整理为 FASTA 格式。上传至 NCBI Batch-CD research 进行结构域分析,分析完成后下载 txt 文件。同时使用 MEGA11 软件,采用邻接法对含有 22 个 *FLA* 序列的 FASTA 文件构建进化树,导出 Newick 格式文件。将以上两个分析后文件导入 Tbtools 的 Gene structure view,生成带有结构域的系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥 *FLAs* 基因家族系统发育分析

为研究拟南芥 *FLAs* 基因家族的进化情况,利用 MEGA11、NCBI Batch-CD research 和 Tbtools 构建了含有蛋白结构域的系统发育树。根据拟南芥 22 个 *FLAs* 蛋白亲缘关系,将 22 个 *FLAs* 聚类在 5 个分支中。其中分支 I 包含 *AtFLA9*、*AtFLA13*、*AtFLA6*、*AtFLA11*、*AtFLA12* 和 *AtFLA7*;分支 II 包含 *AtFLA4*、*AtFLA1*、*AtFLA2*、*AtFLA8* 和 *AtFLA10*;分支 III 包含 *AtFLA14*、*AtFLA3* 和 *AtFLA5*;分支 IV 包含 *AtFLA15*、*AtFLA16*、*AtFLA17* 和 *AtFLA18*;分支 V 包含 *AtFLA19*、*AtFLA21*、*AtFLA20* 和 *AtFLA22*(图 1)。

### 2.2 拟南芥 *FLAs* 基因组织表达分析

通过 eFP Browser 数据库下载 22 个 *FLAs* 基因组织表达数据,并利用 Tbtools 软件进行热图绘制。横轴表示该基因在根、茎、叶、花、种子及角果等不同组织中的表达情况,纵轴表示 22 个 *FLA* 基因,热图进行双向归一化(图 2)。

由图 2 可以看出,*AtFLA3* 和 *AtFLA14* 分别在成熟花粉和雄蕊第 12 时期中表达量最高;*AtFLA11*、*AtFLA12*、*AtFLA16* 和 *AtFLA13* 在茎第二节中表达量最高;*AtFLA19*、*AtFLA20* 和 *AtFLA22* 均在花发育的第 9 时期表达量最高。其中,*AtFLA3* 和 *AtFLA14* 已被报道参与了拟南芥花粉育性调控<sup>[9-10]</sup>。此外,有研究表明

*AtFLA11*、*AtFLA12* 和 *AtFLA16* 基因参与了拟南芥维管和茎发育调控<sup>[7-8]</sup>。据此,依据特异的基因表达模式,推测 *AtFLA19*、*AtFLA20* 和 *AtFLA22* 可能具有育性相关的功能。

前人通过 RNA-seq 对拟南芥雄性母细胞减数分裂过程进行了研究,在减数分裂过程中共富集到 800 多个优势表达基因,其中 *At5g16920* (*AtFLA22*)的原位杂交结果显示该基因在绒毡层和小孢子母细胞中表达<sup>[16]</sup>。结合本研究绘制的基因表达热图和前人文章数据,推测 *AtFLA22* 可能参与调控花粉发育,功能缺失可能会影响拟南芥育性。

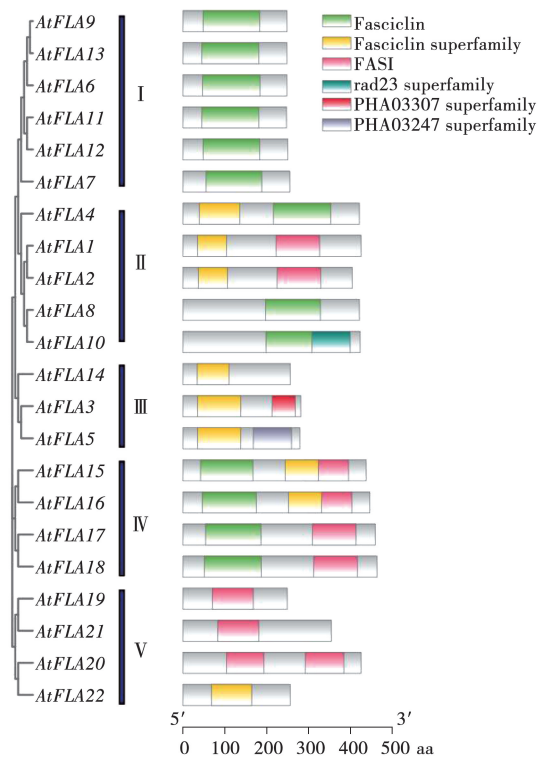


图 1 拟南芥 *FLAs* 蛋白系统发育树

### 2.3 qRT-PCR 检测拟南芥 *AtFLA22* 组织表达情况

通过文献阅读,参考已发表文章确定取样方案<sup>[17-18]</sup>。分别采集拟南芥野生型 Col-0 的根(RT)、下部茎(LSM)、上部茎(USM)、莲座叶(RL)、茎生叶(CL)等营养器官组织和不同发育时期的花苞样品(S6-7、S8-10、S11-13、S14-15),提取总 RNA,利用 qRT-PCR 检测 *AtFLA22* 基因的表达(图 3)。结果表明 *AtFLA22* 在花中特异性表达,提示该基因可能在调控育性中发挥功能。

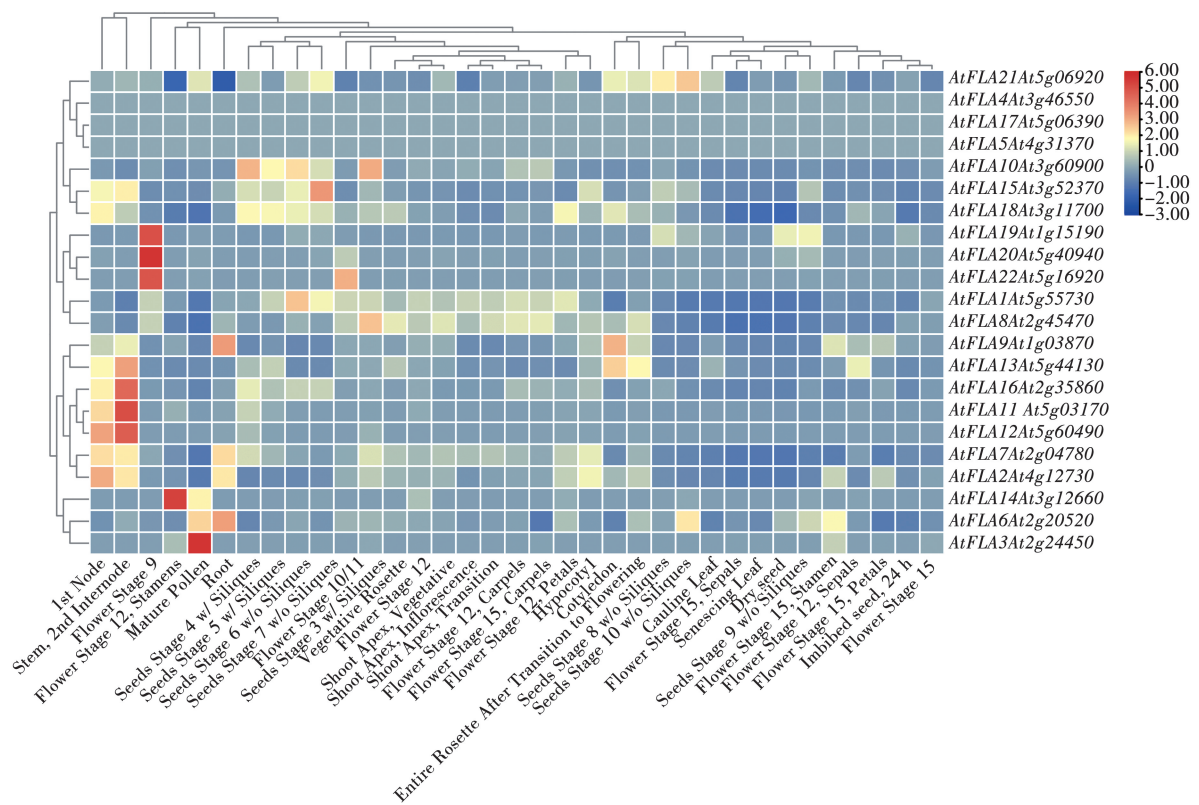


图 2 拟南芥 FLAs 组织表达分析

注:纵轴是 22 个拟南芥 FLAs 基因 ID;横轴是基因在不同组织中表达情况,颜色代表 RPKM,方块越接近红色代表表达量越高,越接近深蓝色代表表达量越低。

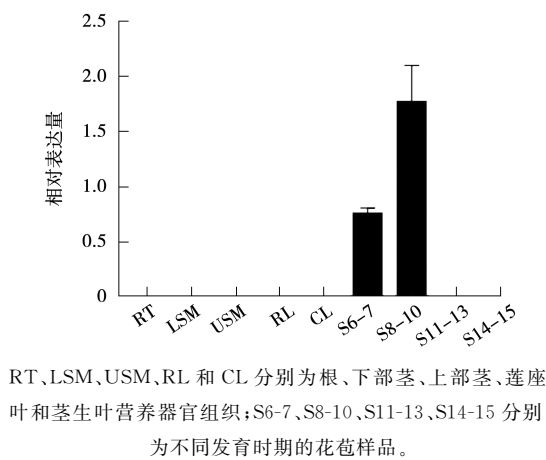


图 3 qRT-PCR 分析 *AtFLA22* 在拟南芥不同组织中的表达情况

2.4 拟南芥 *atfla22* 突变体靶点编辑情况及表型观察

为进一步探究 *AtFLA22* 的生物学功能,结合 Phytozome、NCBI、Uniprot 和 Signal P 多个数据库数据对 *AtFLA22* 进行分析,*AtFLA22* 基因全长 1 118 bp,无内含子序列,N 端有信号肽,具

FAS 结构域。同时借助 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,对 *AtFLA22* 基因设计 CRISPR 敲除靶点,2 个靶点均位于 FAS 结构域 N 端。靶点 1 位于 102~124 bp 区间,靶点 2 位于 155~177 bp 区间(图 4A)。目前已经获得 T2 代转基因苗,其中 *atfla22*(1-2-1)突变体目标基因第 108 位核苷酸插入 A 碱基,造成原本第 12 位半胱氨酸突变为终止密码子 TAG,导致蛋白翻译提前终止(图 4B)。目前观察到相应植株有明显败育表型(图 5A)。

对 T2 代纯合突变体植株表型进行观察,亚历山大红染色情况显示,与野生型相比,*atfla22* 突变体植株花粉粒数目明显减少(图 5B)。此外,突变体角果的长度显著短于野生型,且角果中种子出现败育,其种子结实率较野生型约减少 39%(图 5C~E)。以上表型说明 *AtFLA22* 可能参与拟南芥雄性育性调控,其功能缺失对拟南芥角果长度及种子结实率有显著抑制作用。



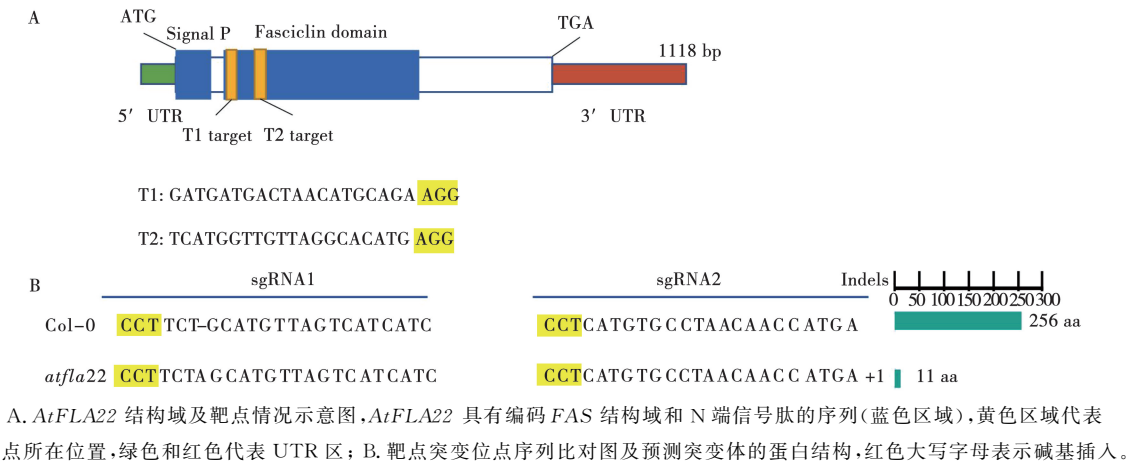


图 4 *AtFLA22* 基因敲除靶点及编辑情况

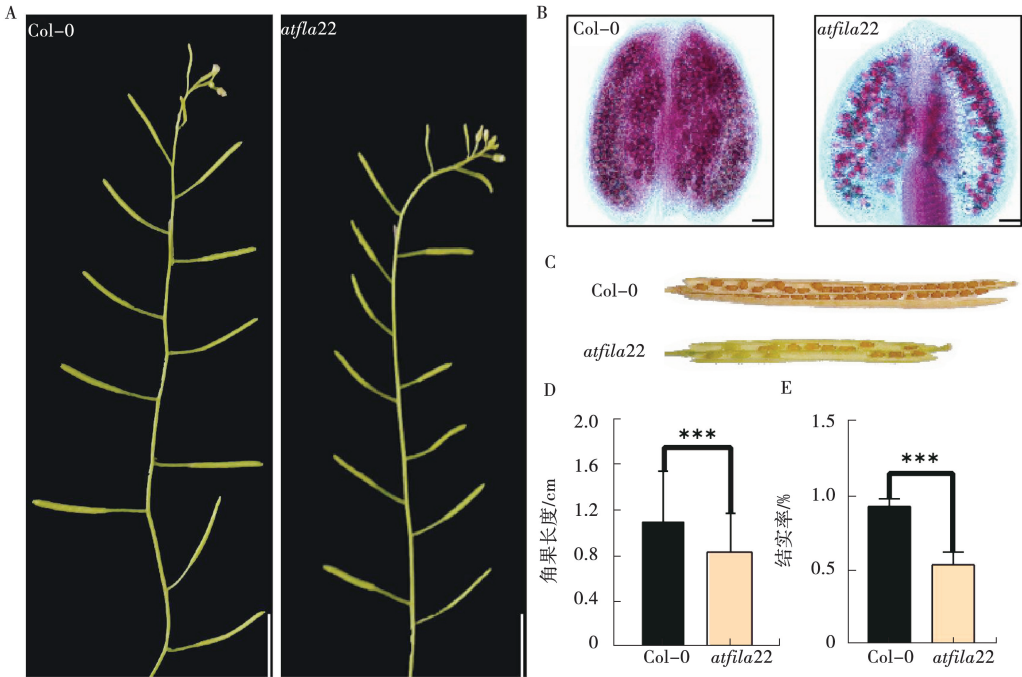


图 5 拟南芥 *atfla22* 突变体表型分析

### 3 讨论

本研究对拟南芥 *FLA* 基因家族进行了分析, 共鉴定到 22 个成员。依据进化关系将其分为 5 个分支。其中分支 I 含有的成员最多, 有 6 个; 分支 III 含有的成员最少, 有 3 个。从结构域的组成看, 分支 II 组成最为复杂, 具有明显分化, 其次是分支 IV。相反, 分支 I 较为保守, 各成员结构域

组成及分布特征较为一致。进一步, 利用 eFP-Browser 数据库基因表达信息, 对 *FLA* 基因家族 22 个成员的表达模式进行了整理。从基因的表达模式看, 分支 II 各成员除 *FLA1* 和 *FLA8* 具有类似的表达模式外, 其余 3 个成员的表达模式明显不同。相反, 分支 I 除 *FLA1* 外, 其余各成员的表达模式基本一致。从这一结果看, 蛋白结构

域组成及分布特征的保守性与基因的表达模式乃至功能的保守性密切相关。

基因的表达模式与其功能的行使有关。从热图展示的结果看,少数 *FLA* 基因(*AtFLA4*, *AtFLA5* 和 *AtFLA17*)没有表达,其余 *FLA* 基因在不同的组织中都有明显的表达量变化。从各基因的表达水平看,多数拟南芥 *FLA* 基因主要在茎、花及种子中表达,表明它们可能参与植物茎发育、育性及种子发育的调控过程。前人的研究结果表明 *AtFLA11*、*AtFLA12* 和 *AtFLA16* 这 3 个基因能够调控植株维管和茎的发育<sup>[7-8]</sup>,分析转录组数据表明 *AtFLA13* 具有类似的表达模式,表明其可能同样参与了拟南芥茎的发育调控过程。此外,*AtFLA19*、*AtFLA20* 和 *AtFLA22* 基因在第 9 期的花中表达量最高;*AtFLA14* 和 *AtFLA3* 基因分别第 12 期的雄蕊和成熟的花粉粒中优势表达;*AtFLA6* 基因虽然在根中的表达量最高,在成熟的花粉粒中的表达量次之,同时其表达模式与 *AtFLA3* 基因较相似。结合前人关于 *AtFLA3*<sup>[9]</sup> 和 *AtFLA14*<sup>[10]</sup> 基因功能的研究及观察到 *AtFLA22* 基因对拟南芥雄性育性的影响,推测这 6 个基因都有可能参与了拟南芥育性的调控过程。其次,*AtFLA1*、*AtFLA8*、*AtFLA10* 和 *AtFLA15* 基因在不同发育阶段的种子中优势表达,表明它们可能参与拟南芥种子形成过程的调控。

利用 *qRT-PCR* 实验对 *AtFLA22* 基因的表达模式进行分析,发现其在第 8 期至第 10 期的花中表达量最高,这与转录组(数据来源: eFP Browser 数据库)分析的结果一致。此外,该基因在第 6 期至第 7 期的花中也有明显表达。前人通过原位杂交实验证明 *AtFLA22* (*At5g16920*) 基因在绒毡层和小孢子母细胞中优势表达<sup>[16]</sup>。这些数据表明 *AtFLA22* 基因在绒毡层中发挥重要作用,参与小孢子发生及雄配子体形成过程的调控。其功能缺失导致花粉粒形成出现障碍,表现为成熟花粉粒数目明显减少,进一步影响双受精过程,造成种子的结实率明显降低。

进化分析结果表明, *AtFLA19*、*AtFLA20* 和 *AtFLA22* 基因都聚在同一个分支,且它们的表达模式基本一致,表明它们在功能上有一定程度的保守性。利用基因敲除实验获得 *atfla22* 纯合突变体,其表现为部分不育,这可能是 *AtFLA19* 和 *AtFLA20* 基因能够部分补偿 *AtFLA22* 基因的功能。为验证这一猜测,后续可以对 *AtFLA19* 和 *AtFLA20* 基因进行敲除,同时构建不同形式

的单基因、双基因及三基因突变体,进而确认它们在调控拟南芥雄性育性方面的功能。

现有研究结果表明,拟南芥 *AtFLA3*<sup>[9]</sup>、*AtFLA14*<sup>[10]</sup> 和 *AtFLA22*,水稻 *OsFLA1*<sup>[11-12]</sup>,陆地棉 *GhFLA19*<sup>[14]</sup>,及芜菁 *BrFLA2*、*BrFLA28* 和 *BrFLA32*<sup>[15]</sup> 都具有调控植物雄性育性的作用,且它们发挥作用的过程并不相同。这一方面表明可能目前对调控拟南芥雄性育性的 *FLA* 基因功能认识不全,后续可以构建包含更多物种的 *FLA* 基因家族进化树,从而更全面地分析调控植物雄性育性 *FLA* 基因的进化历程及功能的保守性。另一方面,这可能暗示 *FLA* 基因在不同植物中调控雄性育性方面功能出现了分化。以水稻和拟南芥为例,它们作为单、双子叶的模式植物,小孢子发生及雄配子体形成过程并不完全一致。这使得讨论 *FLA* 基因在调控单、双子叶植物雄性育性方面功能的分化具有重要意义。

## 4 结 论

通过进化树分析,本研究在拟南芥中共鉴定到 22 个 *FLA* 基因。进化树及基因表达模式分析结果表明,在同一个进化分支中,各成员间序列结构差异越大,它们的表达模式差异越大;相反,各成员间序列结构差异越小,它们的表达模式越相近。从转录组数据看, *AtFLA19*、*AtFLA20* 和 *AtFLA22* 基因的表达模式较为一致,推测它们的功能比较保守。定量分析结果表明, *AtFLA22* 基因在第 6 期至第 10 期的花中优势表达,暗示其在小孢子发生及雄配子体形成过程中发挥作用。据此,推测 *AtFLA19* 和 *AtFLA20* 基因同样具有调控拟南芥雄性育性的功能,这也可能是 *atfla22* 单突变体表现为部分雄性不育的原因。

## 参考文献:

- [1] JOHNSON K L, JONES B J, BACIC A, et al. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4): 1911-1925.
- [2] HE J D, ZHAO H, CHENG Z L, et al. Evolution analysis of the fasciclin-Like arabinogalactan proteins in plants shows variable fasciclin-AGP domain constitutions [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(8): 1-17.
- [3] ELLIS M, EGELUND J, SCHULTZ C J, et al. Arabinogalactan-proteins; key regulators at the cell surface? [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(2): 403-419.
- [4] SEIFERT G J. Fascinating fasciclins; a surprisingly widespread family of proteins that mediate interactions between the cell exterior and the cell surface [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1-28.
- [5] JOHNSON K L, KIBBLE N A, BACIC A, et al. A fasciclin-like

arabinogalactan-protein (FLA) mutant of *Arabidopsis thaliana*, *fla1*, shows defects in shoot regeneration [J]. PLoS One, 2011, 6(9): 1-11.

[6] ASHAGRE H A, ZALTZMAN D, IDAN-MOLAKANDOV A, et al. Fasciclin-like 18 is a new player regulating root elongation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12(12): 1-16.

[7] MA Y X, MACMILLAN C P, VRIES L D, et al. FLA11 and FLA12 glycoproteins fine-tune stem secondary wall properties in response to mechanical stresses [J]. New Phytologist, 2022, 233(4): 1750-1767.

[8] LIU E, MACMILLAN C P, SHAFEE T, et al. Fasciclin-Like Arabinogalactan Protein 16 (FLA16) is required for stem development in *Arabidopsis* [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11(11): 1-16.

[9] LI J, YU M, GENG L L, et al. The fasciclin-like arabinogalactan protein gene, FLA3, is involved in microspore development of *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2010, 64(3): 482-497.

[10] MIAO Y J, CAO J S, HUANG L, et al. FLA14 is required for pollen development and preventing premature pollen germination under high humidity in *Arabidopsis* [J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 1-19.

[11] DENG Y, WAN Y C, LIU W C, et al. OsFLAI encodes a fasciclin-like arabinogalactan protein and affects pollen exine development in rice [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2022, 135(4): 1247-1262.

[12] ZHOU D, ZOU T, ZHANG K X, et al. DEAP1 encodes a fasciclin-like arabinogalactan protein required for male fertility in rice [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(7): 1430-1447.

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

[14] ZHANG M, WEI H L, LIU J, et al. Non-functional GoFLAI9s are responsible for the male sterility caused by hybrid breakdown in cotton (*Gossypium* spp.) [J]. Plant Journal, 2021, 107(4): 1198-1212.

[15] HUANG H, MIAO Y, ZHANG Y, et al. Comprehensive analysis of arabinogalactan protein-encoding genes reveals the involvement of three BrFLA genes in pollen germination in *Brassica rapa* [J]. Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23): 1-23.

[16] YANG H X, LU P L, WANG Y X, et al. The transcriptome landscape of *Arabidopsis* male meiocytes from high-throughput sequencing: the complexity and evolution of the meiotic process [J]. Plant Journal, 2011, 65(4): 503-516.

[17] BHARGAVA A, MANSFIELD S D, HALL H C, et al. MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the *Arabidopsis* inflorescence stem [J]. Plant Physiology, 2010, 154(3): 1428-1438.

[18] 赵芝婧, 李丽红, 要笑云, 等. 拟南芥转录因子 LFY2 的表达和功能分析[J]. 电子显微学报, 2020, 39(3): 294-299.

Effects of AtFLA22 Gene on Fertility in Arabidopsis thaliana

LIN Jiayu, LI Jinhong, FENG Xiangchi, ZHOU Minghui, WANG Ning, CHEN Yifei, LI Meina

(College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Fasciclin-like arabinogalactan proteins (FLAs) are widely distributed in various plants and are involved in plant growth and development. AtFLA22 was identified through RNA-seq from previous study of other group, and its function may be related to anther and pollen development. In order to explore the function of AtFLA22, heat map was drawn according to the data from eFP Browser database, and meanwhile qRT-PCR experiments were performed and further confirmed that AtFLA22 was specific expressed in the flowers. Combined with the above data, it was speculated that AtFLA22 may be involved in fertility regulation. In addition, atfla22 mutant was generated by CRISPR/Cas9 and the insertion of adenine at 108 bp may lead to premature termination of protein translation, and lead to the phenotype with shorter pods and abortive seeds. In conclusion, we revealed that AtFLA22 functions in the regulation of male fertility of Arabidopsis thaliana.

**Keywords:** Arabidopsis thaliana ; fasciclin-like arabinogalactan proteins; male fertility

著作权使用说明

本刊已许可中国知网、维普网、万方数据、博看网、长江文库、超星等知识服务平台以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。本刊支付的稿酬已包含著作权使用费,所有署名作者向本刊提交文章发表之行为视为同意上述声明。

黑龙江农业科学编辑部