

## 一个水稻*MSP1*突变体的鉴定和分析

李京琳<sup>1, #</sup>, 李新鹏<sup>1, #</sup>, 龙湍<sup>1</sup>, 安保光<sup>1</sup>, 曾翔<sup>1</sup>, 吴永忠<sup>2</sup>, 黄培劲<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup>海南波莲水稻基因科技有限公司, 海口570125

<sup>2</sup>海南神农基因科技股份有限公司, 海口570125

**摘要:** 水稻(*Oryza sativa*) *MSP1*基因编码一个LRR-RK蛋白, 调控花药壁和花粉细胞的分化和发育。本研究从钴-60辐射的水稻突变体库中鉴定出一个新的*mSP1*突变体1972m, 其花药明显变小、变白, 花药中不含花粉粒。这一新的*MSP1*等位突变中, 一个LRR单元的一个丝氨酸转变为脯氨酸。结构分析表明这一氨基酸残基突变可能影响了*MSP1*位于细胞外的LRR结构域的稳定性的能力, 从而阻断了花药壁细胞发育信号的转导。

**关键词:** 水稻; 雄性不育; *MSP1*; LRR-RK

花药壁细胞对花粉的发育极为重要(Zhang和Wilson 2009; Liu和Fan 2013)。*MSP1*是较早发现的控制水稻(*Oryza sativa*)花药壁细胞发育并影响雄性育性的基因。水稻*mSP1*突变体中, 花药壁结构紊乱, 绒粘层和中层结构缺失, 而小孢子母细胞数量增多; 由于缺少绒粘层的支持, 花粉母细胞不能完成减数分裂, 导致完全雄性不育; 突变体中大孢子母细胞数量增多, 部分种子形成双胚, 但结实率下降(Nonomura等2003; Yang等2016)。在*mSP1*突变体中检测到*MSP1*自身及与减数分裂、绒粘层发育相关基因下调(Zhou等2009; 王莹等2006)。

*MSP1*编码一个1 294个氨基酸的富亮氨酸重复序列受体激酶(lucine-rich repeat receptor kinase, LRR-RK)。LRR-RK是动植物中普遍存在的一类蛋白, 广泛参与了真核生物发育、抗逆的跨膜信号转导(Diévert和Clark 2004; Trinchieri和Sher 2007), 水稻中已发现300多个LRR-RK基因(Sun和Wang 2011)。植物LRR-RK的典型结构包括位于胞外的膜定位信号肽(signal peptide, SP)、一组或多组连续LRR单元、位于LRR单元之间的间隔序列(island domain, ID)序列、一个跨膜(transmembrane, TM)片段和位于胞内的激酶结构域(kinase domain, KD); 已知一些LRR单元与ID构成配体结合位点, 在胞外结合信号分子后, 激活胞质侧激酶活性, 完成生物信号的跨膜转导(Torii 2004)。LRR-RK一般通过与另一个LRR蛋白形成异源复合体行使功能, 如BRI1/BAK1 (Jiang等2013)和EMS1/SERK1 (Li等2017)等。

水稻*MSP1*是典型的LRR-RK蛋白, 与拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*) EMS1/EXS直系同源(Zhao等2002; Canales等2002); EMS1/EXS配体为TPD1 (Yang等2003; Jia等2008; Huang等2016)。Li等(2017)发现另一LRR蛋白SERK1也与EMS1相互作用, 并进一步提出假说: 在没有TPD1时, EMS1与SERK1在细胞膜上形成松散复合体, 当两个TPD1分子相继与EMS1结合后, EMS1-SERK1复合体结合加强, SERK1与EMS1发生自磷酸化与相互磷酸化, 进一步提高EMS1的激酶活性; 此外, SERK2也参与了EMS1信号途径。水稻*MSP1*的配体分子是TPD1的同源蛋白OsTDL1A, 二者共同调控花药和胚珠发育(Zhao等2008; Hong等2012; Yang等2016)。在*MSP1*/EMS1上下游调控途径方面, Huang等(2017)报道了EMS1可直接磷酸化 $\beta CA$ 基因, 而后者突变也可导致绒粘层发育缺陷。在拟南芥*chal cll1 cll2*三重突变体中, *EMS1*和*TPD1*表达均有上调, 可推测这3个基因参与了EMS1-TPD1途径的调控(何卓娜等2016); 此外, 陆佳楠等(2017)用蛋白组学方法鉴定出一组花药外壁合成基因受EMS1-TPD1调控。

已报道的*mSP1*突变体有5个, 其中*mSP1-1*、2、3均为*Tos17*插入突变造成提前终止(Nonomura等2003), *mSP1-4*和*mSP1-6*分别为缺失和插入突变, 也造成翻译提前终止(Yang等2016)。本研究发现一个新的*mSP1*突变体, 该突变体的一个单碱基突变导致了雄性不育和雌性结实率下降的缺失突变

收稿 2017-07-10 修定 2018-01-30

# 共同第一作者。

\* 通讯作者(bolianrgt2015@aliyun.com)。

表型, 对于MSP1结构-功能关系的理解和信号转导调控机制具有重要价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

水稻(*Oryza sativa* L.)品种‘93-11’辐射突变体库创制见龙湍等(2016)。分别用‘93-11’和‘中花11’花粉为雄性不育突变体1972m授粉, 用于结实率调查; 以‘93-11’和‘明恢63’花粉为1972m授粉, 获得的F<sub>1</sub>和F<sub>2</sub>群体用于遗传分析和不育基因定位。所有水稻材料均按正常大田条件种植于海南波莲水稻基因科技有限公司海南临高育制种基地, 株行距16.3 cm×19.8 cm。

### 1.2 突变体花粉育性鉴定及农艺性状调查

在M<sub>2</sub>代开花散粉期筛选花药异常的突变体, 用碘-碘化钾溶液(0.6% KI, 0.3% I<sub>2</sub>)对花粉染色镜检鉴定花粉育性; 选取即将散粉的野生型和突变体颖花对比拍照。观察突变体植株与野生型植株在株型、株高、穗型、叶色等农艺性状上的差别; 抽穗时将野生型和突变体分别套袋自交或杂交, 籽粒成熟后统计结实率。

### 1.3 DNA提取

取3 cm长的水稻叶片, 在800 μL抽提缓冲液[含1.5% (W/V) CTAB、1.05 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、75 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0)、15 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8.0)]中磨碎, 收集到1.5 mL离心管中。置于56°C水浴中30 min, 间或颠倒混匀。加入800 μL氯仿:异戊

醇(体积比24:1), 混匀, 15 300×g室温离心10 min; 吸上清450 μL, 转移到新离心管中, 加入2倍体积95%乙醇, 混匀后于-20°C放置30 min; 15 300×g离心15 min, 倒掉上清液, 用75%乙醇漂洗沉淀2次; 倒掉75%乙醇, 干燥后加100 μL灭菌超纯水溶解DNA。DNA溶解后稀释至10 ng·μL<sup>-1</sup>, 用作PCR模板。

### 1.4 不育基因初步定位

选取1972m×‘明恢63’的F<sub>2</sub>可育株20株和不育株96株, 提取DNA。根据BSA (bulked segregation analysis)法(Michelmore等1991), 选取不育株和可育株各20株, 将其DNA样本分别混合, 用均匀分布在水稻12条染色体的简单重复序列(simple sequence repeat, SSR) (McCouch等2002)和插入缺失(insertion-deletion, Indel) (Lü等2015)多态标记鉴定混合样品基因型。选出两池间有差异的标记, 对所有突变体单株进行基因型鉴定, 计算突变基因与标记之间的遗传距离。

PCR体系为: *Taq* DNA聚合酶0.5 U、10×缓冲液1 μL (含Mg<sup>2+</sup>)、dNTPs 0.25 μL、10 μmol·L<sup>-1</sup>引物(表1)各0.5 μL、模板DNA 1 μL, 加超纯水补至10 μL。PCR程序为: 95°C预变性3 min; 95°C变性30 s, 55°C复性20 s, 72°C延伸30 s, 35个循环; 72°C延伸5 min后停止反应。PCR产物经6%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 1% AgNO<sub>3</sub>染色10 min, 在甲醛和2% NaOH混合液中显影后拍照读带。

### 1.5 候选基因测序和分析

根据候选基因MSP1基因组序列设计覆盖全

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

标记/引物对	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
RM212	CCACTTTCAGCTACTACCAG	CACCCATTTGTCTCTCAITATG
RM14	CCGAGGAGAGGAGTTTCGAC	GTGCCAATTTCTCGAAAAA
chr1_10926	ATCTAGGATCTTCCATGTATTGAC	ATTAAATGGTTCTCCACGACTC
chr1_10858	CATCCATACTACTTCCCAATTC	GAACAGTATCAAGGAAAGATCTAGG
MSP1_1	TCCCTACTACTAAGGAAGTCACTGTT	GAAGAGGTTAACCATGTCAGTAGC
MSP1_2	GCTACTGACATGGTTAACCTCTTC	CATTTCTTCAGCATCTTCAG
MSP1_3	TCTGACTTCGGCCTTGC	GATCAAGCAGAGAGCATTACATG
MSP1_4	CAAGCAGCAACCATTCTCA	GCAAGGCCGAAGTCAGA
MSP1_5	CATTTAAAGGGTGACGAAC	TGAGAAATGGTTGCTGCTTG
MSP1_6	CTGAAGATGCTGAAGGAAATG	GTTTCGTGACCCCTTTAAATG
Msp1_1972	TGATTTTGTCTTCCAACCAGCGG	ACCATCACCATTGCACAGT
Msp1_RT	GAAACATCCAAACCTCGTCCC	GGTTTCTCAGCCACATCTCG
GAPDH_RT	GCAGGAACCTGAGGAGATC	TTCCCTCCAGTCTTGTCT

长的引物组(表1), 用聚合酶ExTaq (宝生物, 大连) 分别对1972m和野生型‘93-11’进行扩增。PCR体系与基因定位的相同; 反应程序除延伸时间为1 min外, 其余与基因定位相同。PCR产物送广州华大基因公司测序, 用DNAMAN 6.0拼接全长序列, 比对突变体与野生型序列差异, 确定突变位点。采用Phyre2 (Kelly等2015; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)构建蛋白局部3-D模型。

### 1.6 突变位点分子标记与共分离分析

根据突变位点设计衍生酶切扩增多态性序列(derived cleaved amplified polymorphic sequence, dCAPS)标记Msp1\_1972用于鉴定突变位点基因型。用Msp1\_1972引物(表1)扩增样本DNA, PCR体系和程序同前。PCR产物经HaeIII酶切后, 在6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳1 h, 银染和显影后拍照记录。

上述标记鉴定1972m×‘明恢63’的F<sub>2</sub>所有466个可育株和162个不育株的基因型, 用于突变位点与雄性不育表型共分离分析。

### 1.7 突变体MSP1基因的表达分析

用TRIzol RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国)分别提取突变体和野生型‘93-11’的剑叶和1 mm小花的总RNA, 用PrimeScript RT reagent试剂盒(宝生物, 大连)将RNA反转录为cDNA; 在MSP1 cDNA区设计特异引物对Msp1\_RT (表1), 用于荧光定量PCR, 以GAPDH为内参基因(引物对GAPDH\_RT见表1)

(Kathiresan等2002; 张玉芳等2014)。每个处理3次生物学重复。荧光定量PCR采用NOVA<sup>®</sup> Taq SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Premix试剂盒(愚公生命, 连云港), 用PikoReal 96荧光定量PCR仪(Thermo Fisher, 美国)扩增和检测荧光。以野生型小花MSP1表达量平均值为1, 用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>计算各样品中MSP1的相对表达量。

## 2 实验结果

### 2.1 雄性不育突变体表型

在‘93-11’辐射突变体M<sub>2</sub>代编号为1972的家系中找到2株突变体, 命名为1972m。1972m突变体除有包颈外, 株型、叶色、穗型等农艺性状均与野生型‘93-11’无显著差别(图1-A)。对小花进行解剖观察, 可见1972m突变体花药明显变小、变白(图1-B)。显微镜观察表明突变体花药中没有花粉粒(图1-E)。分别用‘93-11’和‘中花11’花粉为突变体授粉, 1972m结实率均低于30%, 远低于另外2个对照雄性不育突变体1907m和2245m(表2)(龙湍等2016), 表明1972m的雌性育性显著下降。在1972m×‘明恢63’的F<sub>1</sub>中, 个别种子萌发时出现双芽(图1-C)。

1972m×‘明恢63’和1972m×‘93-11’的F<sub>1</sub>所有植株育性均正常(表3); F<sub>2</sub>群体中出现育性分离, 可育植株与不育植株符合3:1的分离比(表3), 表明1972m突变表型由核隐性单基因所控制。

### 2.2 雄性不育基因定位

1972m×‘明恢63’的F<sub>2</sub>群体用于不育基因定

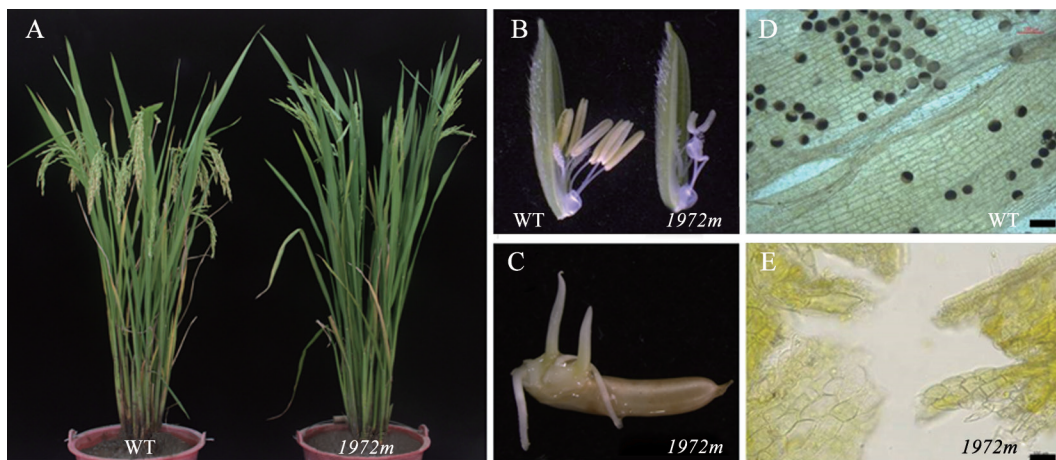


图1 突变体1972m的表型

Fig.1 Phenotypes of the mutant 1972m

A: ‘93-11’野生型(WT)和1972m的植株; B: 1972m和野生型的花药形态; C: 1972m×‘明恢63’的F<sub>1</sub>种子的双芽现象; D: 野生型‘93-11’花粉I<sub>2</sub>-KI染色; E: 1972m花粉I<sub>2</sub>-KI染色。D和E中标尺为100 μm。

表2 水稻不同雄性不育突变体的结实率比较

Table 2 Comparison of seed-setting rates among male-sterile rice mutants

突变体	自交	父本‘93-11’	父本‘中花11’	自然授粉	%
1907m	0	70.9	76.3	11.3	
2245m	0	77.0	81.4	12.4	
1972m	0	25.6	27.4	3.3	

位。用121对在父母本之间有多态的SSR标记引物扩增20株F<sub>2</sub>可育株的DNA混合池和20株F<sub>2</sub>不育株的DNA混合池, 鉴定出在两个位于1号染色体的标记RM212和RM14与不育性状连锁。用这两对标记和附近的两个Indel标记chr1\_10926和chr1\_10858检测F<sub>2</sub>不育株基因型, 将突变基因定位于chr1\_10858和RM14之间, 遗传距离分别为4.5和9.9 cM (图2-A)。

### 2.3 候选基因测序与共分离验证

通过与已克隆的雄性不育基因比较, 发现控制花药壁细胞发育的基因MSP1 (LOC\_Os01g-68870)位于定位区间, 且1972m的雄性不育、异交结实率低以及有多胚现象等表型与msp1突变体一致(Nonomura等2003; 王莹等2006)。对1972m和野生型‘93-11’的MSP1全长基因扩增测序发现, 1972m的MSP1基因(msp1-1972)编码区中第1 879个碱基T突变为碱基C (图2-B)。该突变碱基导致翻译的蛋白质第627位的丝氨酸变为脯氨酸。这一MSP1的突变等位基因命名为msp1-1972。

我们设计了一个dCAPS标记用于检测msp1-1972突变位点: 引物对Msp1\_1972 (表1)的扩增产物以HaeIII酶切, 突变体可酶切得到155 bp片段, 而野生型产物则不能切割, 为178 bp。用这一标记鉴定了1972m×‘明恢63’的F<sub>2</sub>群体所有单株的基因型。结果显示: 雄性不育株全部是纯合突变基因型; 可育株为纯合野生型或杂合型, 没有纯合突变基因型

(图2-C)。由于msp1-1972的MSP1发生错义突变, 该突变位点与表型共分离, 且表型与已知msp1突变体一致, 因此我们确认1972m的雄性不育突变基因就是msp1-1972。

### 2.4 MSP1基因的表达分析

为检验MSP1碱基突变是否影响到该基因表达, 我们设计了MSP1 cDNA特异引物对Msp1\_RT (表1), 以在植物中稳定高表达的GAPDH为内参标记基因, 用荧光定量PCR测定1972m和野生型‘93-11’的MSP1相对表达量。结果显示, MSP1在1972m和野生型‘93-11’的1 mm小花中均有较高表达, 而在叶片中表达极低。与野生型相比, 1972m的MSP1表达差异不大, 表明单碱基突变对MSP1表达影响不大(图3)。因此可以推测, 1972m的突变表型是由于MSP1蛋白序列变化导致的。

### 2.5 突变位点结构分析

MSP1蛋白具有3组LRR和2个ID间隔序列, 第一组最后一个LRR单元(LRR24)是一个植物特异的LRR, 其特征序列为LxxLxxLxLxxNxLs/tGxIP; msp1-1972突变发生于其中的s/t, 紧邻第一个ID (ID1<sub>MSP1</sub>)。由msp1-1972与水稻野生型MSP1的LRR24-ID1-LRR25序列及拟南芥EMS1同源区LRR20-ID2-LRR21的比对可以看到, 除了LRR区域外, ID1<sub>MSP1</sub>与ID2<sub>EMS1</sub>之间也有很高相似度(图4-A和B)。而ID2<sub>MSP1</sub>和ID1<sub>EMS1</sub>在两个蛋白间均无对应的相似序列。

为分析突变氨基酸对蛋白功能的影响方式, 我们用Phyre2 (Kelly等2015; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)分别构建了野生型MSP1和msp1-1972蛋白中包含ID1的LRR23~26片段的3-D结构。在这一片段中, 突变位点氨基酸残基暴露在蛋白外侧的溶液中(图4-C)。野生型中的丝氨酸(Ser)为亲水氨基酸, 有利于维持蛋白结构的稳定; 而突变体中的脯氨酸(Pro)侧链为疏水基团, 不利于蛋白的稳定。

表3 突变体1972m的遗传分析

Table 3 Genetic analysis of the mutant 1972m

组合	F <sub>1</sub> 自交结实率/%	F <sub>2</sub> 可育株数	F <sub>2</sub> 不育株数	$\chi^2$ (3:1) $\chi^2_{0.05}=3.84$
1972m×‘93-11’	91.20	514	196	2.503
1972m×‘明恢63’	87.60	466	162	0.193

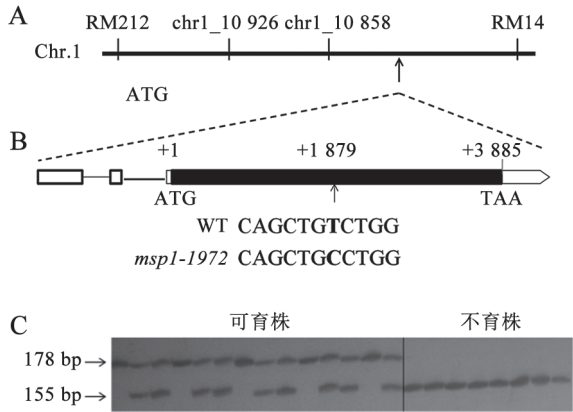


图2 *msp1-1972*的基因定位、突变位点和共分离分析  
Fig.2 Chromosome location, mutation site and co-segregation analysis of *msp1-1972*

A: *msp1-1972*的遗传定位; B: *MSP1*基因结构(箭头指示突变位点); C: 共分离验证, *1972m*×‘明恢63’的F<sub>2</sub>代分离群体dCAPSs标记鉴定。

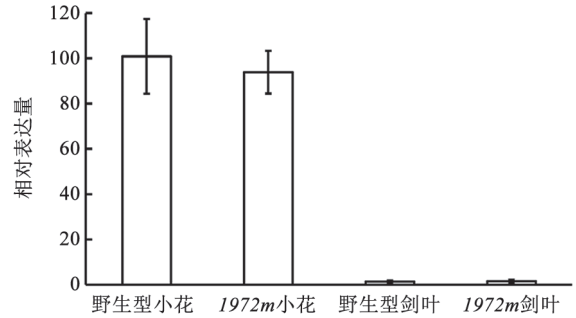


图3 野生型与1972m中MSP1基因的相对表达量  
Fig.3 Relative expression level of *MSP1* in wild type and *1972m*

### 3 讨论

*msp1-1972*突变体表型与前人报道一致(Non-mura等2003; 王莹等2006; Yang等2016), 表明这一

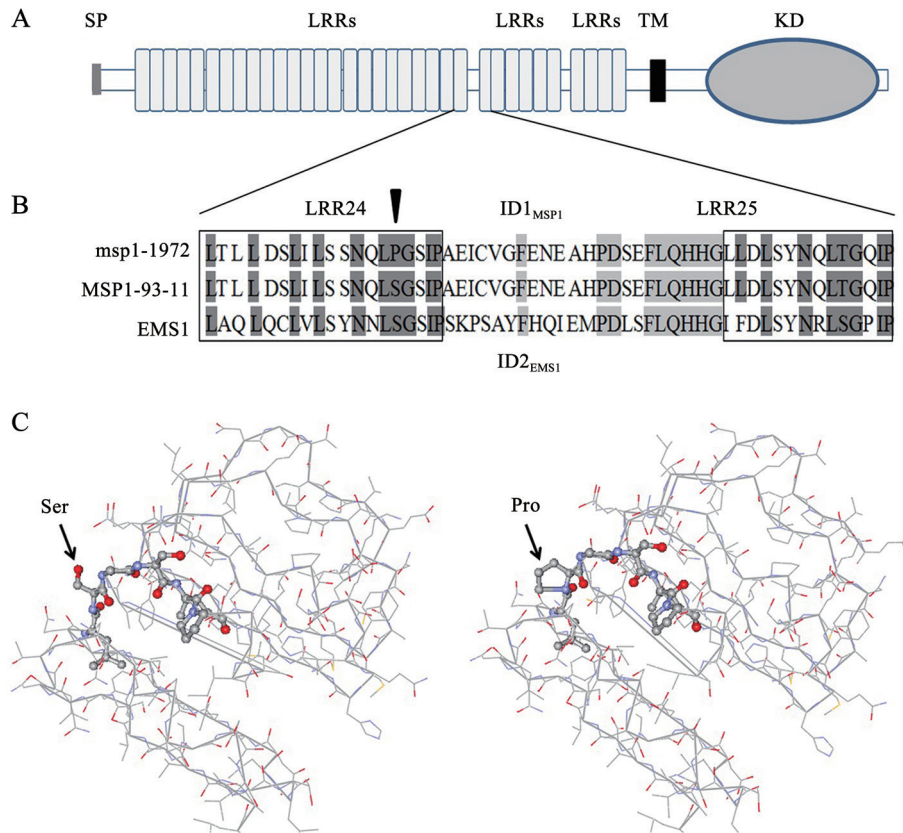


图4 野生型MSP1和突变体msp1-1972蛋白结构分析

Fig.4 Protein structure analysis of wild-type *MSP1* and *msp1-1972*

A: *MSP1*蛋白主要功能结构域。SP: 信号肽; TM: 跨膜结构域; LRR: 富亮氨酸重复单元; KD: 激酶结构域。B: 突变位点两侧氨基酸序列比对。深灰色表示LRR中的保守氨基酸, 浅灰色表示ID1<sub>MSP1</sub>和ID2<sub>EMS1</sub>序列之间的保守氨基酸; 黑色三角指示msp1-1972中突变氨基酸位置。C: 野生型MSP1 (左)和msp1-1972 (右)的LRR23, 24-ID1-LRR25, 26片段的局部3-D结构。

单碱基突变导致了MSP1的生理功能完全丧失。王莹等(2006)报道突变体 $m\text{sp}1-4$ 中突变基因mRNA表达大幅下调,可能是由于突变体mRNA稳定性下降。而本研究中1972m的突变基因表达没有受到明显影响,因此其表型是由于蛋白序列改变所致,非常适合蛋白结构-功能-表型分析。

MSP1蛋白的磷酸化位点位于胞质一侧的激酶结构域、近膜区和C端调控区等(Wang等2005; Karlova等2009; Mitra等2015)。 $m\text{sp}1-1972$ 蛋白突变位点位于细胞膜外侧,因此突变体表型不大可能由于磷酸化特性改变造成。在植物特有的LRR中, Ls/tGxIP基序形成一个半转角(half-turn)结构, S或T残基中的羟基对这一结构的稳定性十分重要(Kajava 1998); 这一半转角结构可能为LRR重复单位之间结合所需,是植物LRR形成特有的马蹄形结构所必需的(Hothorn等2011)。3-D模型表明, MSP1的LRR24中该基序的s/t位点的氨基酸侧链暴露于蛋白外侧(图4-C), 该残基转变为脯氨酸后, 亲水的含羟基侧链被疏水侧链取代, 极可能破坏半转角结构的稳定性, 导致LRR单元结构改变。

油菜素内酯受体BR11是植物中与MSP1和EMS1相似度最高的蛋白, 对拟南芥BR11晶体结构的研究表明, LRR重复序列构成螺旋管结构, 而ID序列伸入管内, 与管壁共同构成配体结合部位(Hothorn等2011; Jiang等2013)。OsTDL1A是拟南芥TPD1的同源蛋白, ID<sub>1MSP1</sub>与ID<sub>2EMS1</sub>之间也有较高相似度(图4-B), 可以推测ID<sub>1MSP1</sub>可能参与了与OsTDL1A的结合。Yang等(2016)研究表明, MSP1与OsTDL1A的结合位点位于607~914片段内, 这一片段完整包含了LRR24和2个ID序列。Huang等(2016)在EMS1中鉴定到2个可与TPD1结合的片段, 其中一个也包含了LRR20<sub>EMS1</sub>-ID2<sub>EMS1</sub>-LRR21<sub>EMS1</sub>。综上所述, LRR24<sub>MSP1</sub>和/或ID1<sub>MSP1</sub>可能也参与了与信号分子或和SERK蛋白的结合; 而 $m\text{sp}1-1972$ 点突变导致的该LRR单元结构改变, 有可能直接破坏MSP1分子与底物的结合, 进而阻断了绒粘层和中层细胞分化信号的转导。

MSP1是水稻花药早期发育中一个重要的信号转导蛋白, 但其重要的氨基酸功能研究并不多。本研究提供了一个新的MSP1突变体, 其ID1之前的LRR单元中一个氨基酸残基改变导致了典型的缺失突变表型, 为深入研究MSP1乃至植物特有LRR蛋白结构功能提供了重要材料。

## 参考文献(References)

- Canales C, Bhatt AM, Scott R, et al (2002). EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 12 (20): 1718–1727
- Diévar A, Clark SE (2004). LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, 131: 251–261
- He ZN, Wang SS, Ma H, et al (2016). Peptide hormones *CHAL*, *CLL1*, and *CLL2* are important for stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol J*, 52 (2): 167–176 (in Chinese with English abstract) [何卓娜, 王双双, 马红等(2016). 胞外多肽激素基因*CHAL/CLL1/CLL2*在拟南芥雄蕊发育过程中发挥重要作用. *植物生理学报*, 52 (2): 167–176]
- Hong L, Tang D, Shen Y, et al (2012). MIL2 (MICROSPOROLESS2) regulates early cell differentiation in the rice anther. *New Phytol*, 196 (2): 402–413
- Hothorn M, Belkhadir Y, Dreux M, et al (2011). Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BR11. *Nature*, 474 (7352): 467–471
- Huang J, Li Z, Biener G, et al (2017). Carbonic anhydrases function in anther cell differentiation downstream of the receptor-like kinase EMS1. *Plant Cell*, 29 (6): 1335–1356
- Huang J, Zhang T, Linstroth L, et al (2016). Control of anther cell differentiation by the small protein ligand TPD1 and its receptor EMS1 in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 12: e1006147
- Jia G, Liu X, Owen HA, et al (2008). Signaling of cell fate determination by the TPD1 small protein and EMS1 receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 2220–2225
- Jiang J, Zhang C, Wang X (2013). Ligand perception, activation, and early signaling of plant steroid receptor brassinosteroid insensitive 1. *J Integr Plant Biol*, 55 (12): 1198–1211
- Kajava AV (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol*, 277: 519–527
- Karlova R, Boeren S, van Dongen W, et al (2009). Identification of *in vitro* phosphorylation sites in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinases. *Proteomics*, 9 (2): 368–379
- Kathiresan A, Khush GS, Bennett J (2002). Two rice *DMC1* genes are differentially expressed during meiosis and during haploid and diploid mitosis. *Sex Plant Reprod*, 14: 257–267
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10 (6): 845–858
- Li Z, Wang Y, Huang J, et al (2017). Two SERK receptor-like kinases interact with EMS1 to control anther cell fate determination. *Plant Physiol*, 173: 326–337

- Liu L, Fan XD (2013). Tapetum: regulation and role in sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 83 (3): 165–175
- Long T, An BG, Li XP, et al (2016). Construction and screening of an irradiation-induced mutant library of *indica* rice 93-11. *Chin J Rice Sci*, 30 (1): 44–52 (in Chinese with English abstract) [龙湍, 安保光, 李新鹏等(2016). 籼稻93-11辐射诱变突变体库的创建及其筛选. *中国水稻科学*, 30 (1): 44–52]
- Lu JN, Ye JY, Xu JX, et al (2017). Quantitative proteomics analysis reveals the signaling networks downstream of EMS1 in the regulation of anther development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol J*, 53 (7): 1287–1296 (in Chinese with English abstract) [陆佳楠, 叶娟英, 许俊旭等(2017). 定量蛋白质组学方法揭示受体蛋白激酶EMS1调控拟南芥花药发育的下游信号网络. *植物生理学报*, 53 (7): 1287–1296]
- Lü Y, Cui X, Li R, et al (2015). Development of genome-wide insertion/deletion markers in rice based on graphic pipeline platform. *J Integr Plant Biol*, 57 (11): 980–991
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, et al (2002). Development and mapping of 2 240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*, 9: 199–207
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (21): 9828–9832
- Mitra SK, Chen R, Dhandaydham M, et al (2015). An autophosphorylation site database for leucine-rich repeat receptor-like kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 82 (6): 1042–1060
- Nonomura K, Miyoshi K, Eiguchi M, et al (2003). The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell*, 15: 1728–1739
- Sun X, Wang GL (2011). Genome-wide identification, characterization and phylogenetic analysis of the rice LRR-kinases. *PLoS ONE*, 6 (3): e16079
- Torii KU (2004). Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol*, 234: 1–46
- Trinchieri G, Sher A (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, 7 (3): 179–190
- Wang X, Goshe MB, Soderblom EJ, et al (2005). Identification and functional analysis of *in vivo* phosphorylation sites of the *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive1 receptor kinase. *Plant Cell*, 17 (6): 1685–1703
- Wang Y, Wang YF, Zhang DB (2006). Identification of rice (*Oryza sativa* L.) mutant *msp1-4* and expression analysis of its *UDTI* and *GAMYB* genes. *J Plant Physiol Mol Biol*, 32 (5): 527–534 (in Chinese with English abstract) [王莹, 王幼芳, 张大兵(2006). 水稻*msp1-4*突变体的鉴定及其*UDTI*和*GAMYB*基因的表达分析. *植物生理与分子生物学学报*, 32 (5): 527–534]
- Yang L, Qian X, Chen M, et al (2016). Regulatory role of a receptor-like kinase in specifying anther cell identity. *Plant Physiol*, 171 (3): 2085–2100
- Yang SL, Xie LF, Mao HZ, et al (2003). Tapetum determinant1 is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. *Plant Cell*, 15: 2792–2804
- Zhang DB, Wilson ZA (2009). Stamen specification and anther development in rice. *Chin Sci Bull*, 54: 2342–2353
- Zhang YF, Zhao LJ, Zeng YL (2014). Selection and application of reference genes for gene expression studies. *Plant Physiol J*, 50 (8): 1119–1125 (in Chinese with English abstract) [张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲(2014). 基因表达研究中内参基因的选择与应用. *植物生理学报*, 50 (8): 1119–1125]
- Zhao DZ, Wang GF, Speal B, et al (2002). The *EXCESS MICROSPOROCTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev*, 16: 2021–2031
- Zhao X, de Palma J, Oane R, et al (2008). OsTDL1A binds to the LRR domain of rice receptor kinase MSP1, and is required to limit sporocyte numbers. *Plant J*, 54: 375–387
- Zhou W, Zhao JX, Lou CJ, et al (2009). Transcript level analyses of genes expressed during rice meiosis in wild type and *Msp1* mutant. *J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed)*, 37 (11): 69–78

## Identification and characterization of a rice *MSP1* mutant

LI Jing-Lin<sup>1,#</sup>, LI Xin-Peng<sup>1,#</sup>, LONG Tuan<sup>1</sup>, AN Bao-Guang<sup>1</sup>, ZENG Xiang<sup>1</sup>, WU Yong-Zhong<sup>2</sup>, HUANG Pei-Jin<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Hainan Bolian Rice Gene Technology Co., Ltd., Haikou 570125, China

<sup>2</sup>Hainan Shennong Gene Technology Co., Ltd., Haikou 570125, China

**Abstract:** Rice (*Oryza sativa*) MSP1 is a leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK) which regulates differentiation and development of tapetum and pollen. In this study, we identified and characterized a new rice *msp1* mutant allele from a rice mutant library induced by <sup>60</sup>Co- $\gamma$  radiation. In this new mutant allele, a conserved serine was replaced by a proline in a LRR unit of *msp1*. This amino acid exchange may disrupt the stability of LRR structure and affect its ability to bind ligands. This results in blocking the signal transduction during anther wall development.

**Key words:** rice; male sterility; MSP1; LRR-RK

---

Received 2017-07-10 Accepted 2018-01-30

#Co-first authors.

\*Corresponding author (bolianrgt2015@aliyun.com).