

一个控制拟南芥小孢子发育基因的定位*

冯丹丹, 吴玉婷, 张帆, 张森, 杨仲南, 高菊芳**

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 通过 EMS 诱变、背景纯化与遗传分析, 从拟南芥突变群体中分离到一株单隐性核位点控制的雄性部分不育突变体 pms15-16-2-3。细胞学观察表明, 突变体在花药发育的过程中, 中层细胞延迟降解, 绒毡层细胞形态分化异常, 出现异常的四分体, 导致最终只能形成少量的花粉。利用图位克隆的方法对该基因进行了定位, 结果表明 PMS15-16-2-3 基因位于拟南芥第 3 条染色体 BAC 克隆 T24C20 上的 28 kb 区间内。目前该区间内尚未见到控制小孢子发育基因的报道, 因此该基因是一个控制小孢子发育的新基因。本研究结果对目的基因的克隆及其在花粉发育中的功能研究奠定了基础。

关键词: 拟南芥; 雄性不育; 小孢子; 图位克隆; 定位

中图分类号: Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2008) 04-471-06

Mapping of an *Arabidopsis* Gene Involved in Microspore Development*

FENG Dan-Dan, WU Yu-Ting, ZHANG Fan, ZHANG Sen,
YANG Zhong-Nan, GAO Ju-Fang**

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: An *Arabidopsis* partial male-sterile mutant was isolated from a library of mutants mutagenized by ethyl methane sulfonate (EMS) treatment. Genetic analysis indicated that the mutant was controlled by a single recessive nuclear gene named PMS15-16-2-3. Cytological observations of the anther development of pms15-16-2-3 mutant and the wild-type plant showed that the mutant middle layer degenerated later, both the tapetal cell morphology and the tetrads were abnormal, which resulted in few fertile pollen grains formed in the anther. The mutant PMS15-16-2-3 gene was mapped to a region of 28-kb in BAC T24C20 on chromosome 3 using a map-based cloning strategy. No genes involved in microspore formation were reported in this region, so we believe that PMS15-16-2-3 gene could be a new gene controlling microspore development in *Arabidopsis*. This work provides the basis for further molecular cloning and functional analysis of this gene in *Arabidopsis* pollen development.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Male sterile; Microspore; Map-based cloning; Mapping

雄性生殖发育异常导致可遗传的完全不育或育性降低是被子植物十分显著的现象 (Kaul, 1988)。近年来, 花药发育研究所取得的进展得益于模式植物遗传学的发展, 特别是拟南芥花药发育突变体的分析。此外, 随着分子生物学技术

的进步, 克隆了许多花药特异表达基因, 对理解花药发育的机理提供了必不可少的资料。

花药发育的细胞学研究已经详细了解了花药发育过程中各个时期所发生的重要的细胞学事件 (Regan and Moffatt, 1990; Smyth 等, 1990; Bowman

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30530100, 30671127) 资助

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: gaojufan@shnu.edu.cn

收稿日期: 2008-01-04, 2008-04-16 接受发表

作者简介: 冯丹丹 (1982-) 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物基因功能研究工作。

等, 1991; Goldberg 等, 1993)。拟南芥花药发育从雄蕊原基发生到花药开裂脱落可划分为 15 个时期 (Sanders 等, 1999)。在第 1~4 期, 花药原基开始细胞分裂形成各种组织, 逐渐形成四角结构, 包含成熟药室的腔、壁、连接细胞和导管区域。在第 5 期, 四角结构中的孢子体细胞逐渐分化形成了药室内壁层、中层、绒毡层和小孢子母细胞。小孢子母细胞经过第 6~7 期的减数分裂形成含有单倍体小孢子的四分体, 四分体外包裹有一层厚厚的胼胝质层, 中层细胞开始退化直至消失。第 8 期小孢子从四分体中释放出来, 并在 9~12 期经过两次有丝分裂形成三核花粉粒, 绒毡层在第 11 期降解, 第 12 期隔膜细胞开裂, 花药分为两个药室。第 13 期花药在裂缝处开裂, 花粉粒释放。第 14 期雄蕊开始衰老, 细胞与花药结构收缩。第 15 期雄蕊从衰老的花中脱落下来。

绒毡层是一层独特的分泌细胞层, 位于花药药室壁四层孢子体细胞的最内层, 与配子体直接相连。由于绒毡层细胞与发育的小孢子或花粉之间存在着这种直接接触的关系, 当这种正常的交流出现紊乱时, 就会导致雄性不育。雄性不育的发生与绒毡层正常的发育途径受干扰有关。已有许多控制拟南芥绒毡层细胞发育命运的相关基因被克隆, 如 MS1 (Wilson 等, 2001; Ito and Shinzaki, 2002)、EMS1 (Zhao 等, 2002)、AtGPT1 (Zheng 等, 2003)、TPD1 (Yang 等, 2003a)、AMS (Sorensen 等, 2003)、DYT1 (Zhang 等, 2006) 等, 当这些基因发生突变时, 都因绒毡层发育异常而不能形成正常的花粉粒, 造成雄性不育。

减数分裂是配子体发生过程中的重要事件。目前, 在拟南芥中已报道的与小孢子减数分裂有关的基因有 MMD1, 该基因编码 PHD-finger 转录因子, 该转录因子负责调控减数分裂时的基因表达, 其突变将导致性母细胞死亡 (Yang 等, 2003b); SYN1 基因编码一个 RAD21 相关蛋白, 该蛋白在染色体浓缩和姐妹染色单体配对的过程中起作用 (Bai 等, 1999; Cai 等, 2003); ASK1 基因的突变造成染色体减数分裂后期染色体分裂不均一 (Yang 等, 1999; Yang 等, 2006); MS5/Pollenless3 基因则调控着减数分裂期的分裂过程 (Glover 等, 1998); MEI1 基因与染色体重组修复相关, 该突变体的四分体异常, 经常形成 5

~8 个不均匀的小孢子的四分体 (He and Mascarenhas, 1998)。

本文通过 EMS (ethyl-methane sulfonate) 诱变处理野生型拟南芥群体, 分离得到一株雄性部分不育突变体 pms15-16-2-3。遗传分析表明该突变体的性状是由单个隐性核基因控制的。该突变体花药发育的细胞学观察表明, 突变体花药在中层细胞退化, 绒毡层细胞形态分化及小孢子母细胞减数分裂等方面出现异常, 造成大量小孢子形态不正常, 最后仅形成少量可育花粉, 部分果荚中结少量种子。我们利用图位克隆的方法对突变基因进行了定位, 结果表明, PMS15-16-2-3 基因位于第 3 条染色体上 BAC 克隆 T24C20 内的 28 kb 区间内。这些结果为基因的克隆及研究该基因的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 分别以 Landsberg erecta (Ler) 和 Columbia (Col) 为遗传背景, 拟南芥雄性部分不育突变体 pms15-16-2-3 由本实验室经 EMS 诱变获得。种植方法同易君等 (2006)。

1.2 方法

1.2.1 遗传分析 以野生型 Ler 为父本, 突变体为母本进行杂交得到 F₁ 代, F₁ 代自交得到 F₂ 代。种植 F₂ 代, 观察 F₂ 代表型, 统计 F₂ 代中可育植株与不育植株的比例。

1.2.2 雄性部分不育基因的定位 收集用野生型 Col 作为父本与突变体杂交所得到的 F₂ 遗传群体中的突变体用于基因定位。基因初定位的方法及所用分子标记同易君等 (2006), 一旦找到了连锁的分子标记, 就在该分子标记附近设计新的分子标记 (表 1), 用高通量提取 DNA 的方法 (Xin 等, 2003) 提取大批 F₂ 遗传群体中的突变体单株 DNA, 对这些植株进行基因型分析, 对目的基因进行进一步定位。

1.2.3 DNA 提取 拟南芥基因组 DNA 的提取参照 Sun 等 (2000) 的方法。

1.2.4 PCR 反应 PCR 反应参照 Sun 等 (2000) 的方法。分子标记 T32N15、F13I23、F1P2、T24C20、T8P19、F24M12、T22E16 等是根据网站 www.arabidopsis.org 上公布的拟南芥基因组多态性数据库, 采用软件 Primer premier 5.0 设计的。引物的序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。用 2.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳验证 2 个亲本 Ler 和 Col 之间的多态性。

1.2.5 花药发育的光学显微镜观察 野生型与突变体植株的花序在 FAA 固定液中固定 12 ~ 24 小时后，用 50% 乙醇洗 2 ~ 3 次，常规脱水，spurr 树脂包埋，切片，片厚 1 μm ，1% 甲苯胺蓝染色后在显微镜下观察并拍照 (Zhang 等, 2007)。

1.2.6 花粉粒的扫描电镜观察 在解剖镜下分离野生型和突变体植株 13 期的花药，置于金属台上，真空干燥后喷金，扫描电镜观察并拍照记录 (Zhang 等, 2007)。

2 结果与分析

2.1 突变体 pms15-16-2-3 的表型分析

突变体 pms15-16-2-3 是经化学诱变剂 EMS 诱导拟南芥野生型 Ler 筛选得到的。突变体在生长过程中表现出正常的营养生长和花的发育 (图 1: A)，而且正反杂交的实验证明其雌蕊是完全可育的 (数据未显示)。但是，与野生型植株比较，突变体的多数果荚生长缓慢且短小、萎缩，成熟后不含种子，只有少数会产生含种子的果荚 (图 1: B)。将这些种子种下，后代会产生同样的表型，说明突变体的花粉育性下降，属于部分雄性不育突变体。

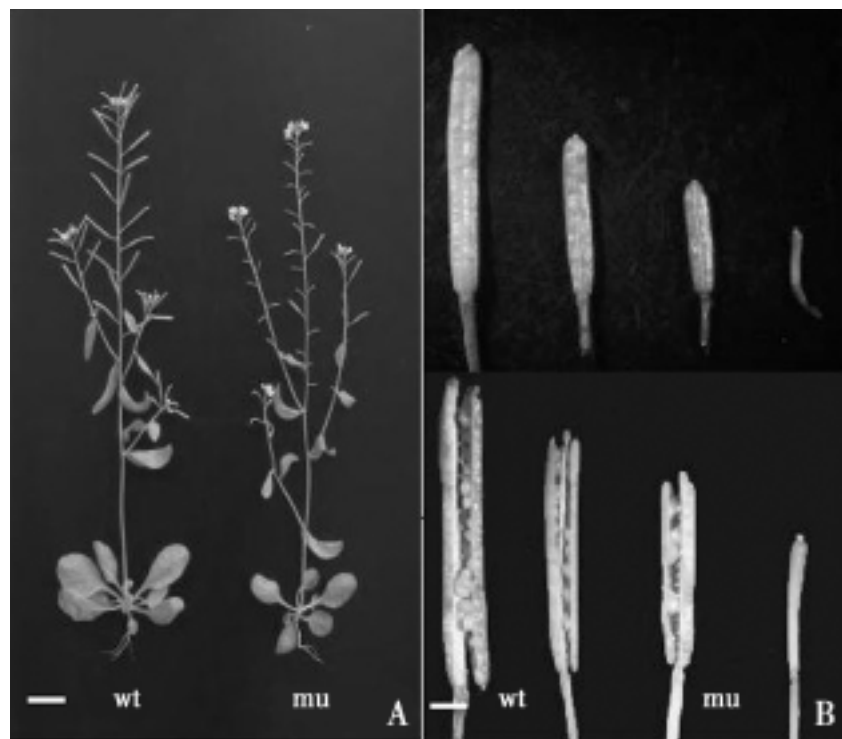


图 1 野生型和突变体 pms15-16-2-3 植株形态和果荚比较 野生型植株具有正常的果荚，且果荚内种子数量多 (A 左，B 左)；突变体植株具有短小的果荚，果荚内只有少量种子或无种子 (A 右，B 右)。A 中标尺 = 2 cm；B 中标尺 = 1 cm。

wt: 野生型, mu: 突变体

Fig. 1 Morphology comparison of the wild-type and pms 15-16-2-3 mutant plant

A wild-type plant showing normal seedpods which contains many seeds (left of A and B); a mutant plant with small seedpods with no or a few seeds (right of A and B). Bar in A = 2 cm; Bar in B = 1 cm

为了进一步分析突变体 pms15-16-2-3 部分雄性不育的原因，我们采用树脂半薄切片观察花药横切面以及扫描电镜观察花粉粒外貌的方法，比较了野生型和突变体花药发育的过程。观察表明，在花药发育的前 5 个时期，突变体的花药和野生型的花药在花药形态建成过程中没有明显的差异，都能形成形态完整的四个药室 (数据未显示)。但从花药发育第 6 个时期开始可以看到突变体花药与野生型的明显不同的现象：在花药发育的第 6 期，野生型中层细胞开始衰退，细胞变成细长型，在中层与药室内壁以及中层与绒毡层之间出现空隙 (图 2: A)，而突变体的中层细胞仍保持扁圆形，但细胞内空泡化，仅残留细胞壁，分别与绒毡层和药室内壁紧贴 (图 2: E)；第 7 期早期野生型小孢子母细胞减数分裂完成，形成了含有四个小孢子的四分体，中层细胞进一步退化 (图 2: B)，晚期绒毡层细胞紧贴药室内壁，分化为分泌型细胞，分泌胼胝质酶分解四分体周围的胼胝质 (图 2: C)，而突变体有的药室中的小孢子母细胞减数分裂不正常，会出现含 5 ~ 6 个小孢子的四分体，中层细胞在 7 期早期仍保留第 6 期的形状，晚期在药室内壁与绒毡层之间形成一条着色很深的细线，并且绒毡层细胞彼此之间的细胞界限清晰，尚未形成分泌型绒毡层 (图 2: F, G)；第 8 期野生型药室中层细胞消失，小孢子从胼胝质包裹的四分体中释放出来 (图 2: D)，突变体药室此时与野生型的主要不同是有些绒毡层细胞体积明显增大 (图 2: H)；第 9 ~ 10 期野生型花粉外壁形成，小孢子细胞内开始积累营养物质 (图 2: I)，但突变体此时药室中不仅绒毡层细胞形态与野生型不同，而且大量小孢子细胞内容物消失，仅残留花粉外壁 (图 2: M)；第 11 ~ 13 期野生型花药药室绒毡层细胞开始退化并消失，小孢子经两次有丝分裂形成三核花粉粒，花药开裂释放花粉粒 (图 2: J, K)，扫描电镜观察成熟花粉粒，形态正常 (图 2: L)，突变体花药药室绒毡层细胞、药室隔膜细胞及裂缝细胞在第 11 ~ 13 期的发育过程与野生型类似，只是仅有少量发育正常的花粉粒 (图 2: N, O, P)。

上述结果表明，突变体中层细胞退化异常、绒毡层细胞在 7 ~ 10 期形态异常以及减数分裂异

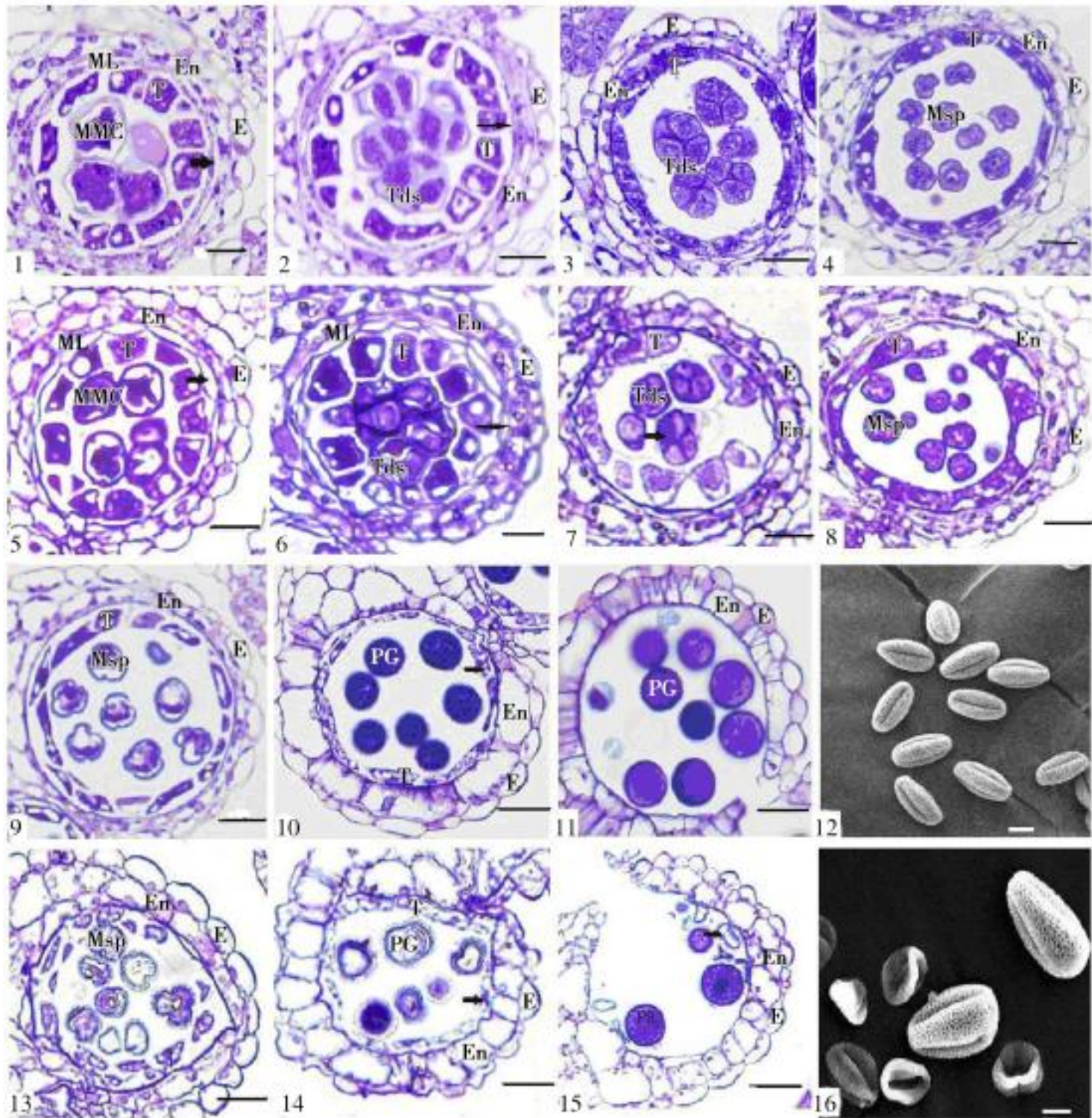


图2 野生型和 pms15-16-2-3 突变体花药发育的比较

1. 野生型第6期花药横切; 2. 野生型第7期早期花药横切, 小孢子母细胞完成减数分裂, 形成四分体, 箭头所指为残留中层细胞; 3. 野生型第7期晚期花药横切, 中层细胞消失; 4. 第8期野生型绒毡层细胞和小孢子形态; 5. 突变体第6期花药横切, 箭头所指为中层细胞; 6. 突变体第7期早期花药横切, 箭头所指为中层细胞, 其形状与第6期的相同; 7. 突变体第7期晚期花药横切, 残留的中层细胞形成着色深的细线位于绒毡层细胞和药室内壁细胞之间, 箭头所指为不正常的四分体; 8. 第8期突变体绒毡层细胞和小孢子形态; 9. 野生型第9期花粉外壁形成; 10. 野生型第11期; 11. 野生型第12期花药横切; 12. 野生型13期花粉呈长椭圆体, 外观饱满, 外壁纹饰结构和萌发沟清晰; 13. 突变体第9期花粉外壁, 但小孢子内容物少; 14. 突变体(N)的第11期, 花药绒毡层开始退化, 箭头所指为绒毡层; 15. 突变体第12期花药横切; 16. 突变体13期花粉少数与野生型的相似, 但多数为瘪的。表皮细胞(E)、药室内壁细胞(En)、中层细胞(ML)、绒毡层细胞(T)、四分体(Tds)、小孢子母细胞(MMC)、小孢子(Msp)以及花粉粒(PG)。标尺=10微米。

Fig. 3 Comparison of wild-type and pms15-16-2-3 mutant anther development

1. Stage 6 wild-type anther; 2. Early stage 7 wild-type anther. Microspore mother cell finishing meiosis, tetrads are formed. The arrow indicates the remnants of middle layer cells; 3. Late stage 7 wild-type anther. The middle layer disappeared; 4. Stage 8 wild-type anther. 8; 5. Stage 6 mutant anther. The arrow points to the middle layer cell; 6. Early stage 7 mutant anther. The arrow shows the middle layer cells similar to those of stage 6; 7. Late stage 7 mutant anther. Heavily stained remnants of middle layer exist between tapetum and endothelium. The arrow shows an abnormal tetrad; 8. Stage 8 mutant anther. The microspores are released as the wild-type, but the size of microspores and the shape of tapetal cells are different from that of wild-type; 9. Stage 9 wild-type anther; 10. Stage 11 wild-type anther; 11. Stage 12 wild-type anther; 12. The released wild-type pollen grains are full-shaped, with sculptured exine walls, and visible apertures; 13. Stage 9 mutant anther. The exine wall of microspores formed, while some microspores are devoid of intracellular substances; 14. Stage 11 mutant anther. The arrow shows tapetum degenerated. Only few pollen grains accumulate nutrients and stained deeply; 15. Stage 12 mutant anther; 16. Only few released mutant pollen grains are normal. Most are collapsed. E, epidermis; En, endothecium; ML, middle layer; T, tapetum; Tds, tetrads; MMC, microspore mother cell; Msp, microspore; PG, pollen grains. Bars = 10 μ m.

常，造成了大多数小孢子不能正常发育，最终仅形成少量正常成熟的花粉。说明 PMS15-16-2-3 基因会影响小孢子母细胞的减数分裂过程以及影响中间层细胞和绒毡层细胞的正常发育过程。

2.2 突变体 pms15-16-2-3 的遗传分析

为了确定 pms15-16-2-3 突变体是否由单个基因控制，将野生型 Ler 作为父本，突变体作为母本杂交得到 F_1 代， F_1 代自交得到 F_2 代种子。种植 F_2 代，观察 F_2 代表型，统计 F_2 代中可育植株与部分不育植株的比例。一共种植了三盆， F_1 代植株全为可育的野生型表型，而 F_2 代中可育植株与部分不育植株为 268 : 88，经卡方检测， $\chi^2_{[1]} > 0.0039$ ， $P < 0.95$ 其实际比例和理论比例没有明显差异，表明该突变体表型是隐性单基因控制的。

2.3 突变体 pms15-16-2-3 的遗传定位

为了进一步研究 pms15-16-2-3 突变体并最终克隆该基因，我们进行遗传定位以确定该突变基因在染色体上的位置。首先，我们选用了在拟南芥基因组五条染色体上分布均匀的 20 对分子标记（引物序列见易君等，2006）进行了基因的初定位连锁分析。这 20 对分子标记在野生型 Ler 和 Col 之间具有序列的多态性。以这些分子标记进行 PCR，结果表明突变基因 PMS15-16-2-3 与第 3 条染色体上分子标记 CIW4 连锁。利用新设计的分子标记（表 1）结合用高通量 PCR 方法（Xin 等，2003），最终将基因 PMS15-16-2-3 定位在第 3 条染色体 BAC 克隆 T24C20 上 28 kb 区间内（图 3）。

表 1 基因定位所涉及的分子标记引物序列

Table 1 The sequences of molecular markers involved in gene mapping

Marker	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
CIW11	CCCCGAGTTGAGGTATT	GAAGAAAATTCCTAAAGCATT
T32N15	CTTTGATCATGAATGGTAGTGTT	AAATGCTTAGCTAATGAAAGTGAC
F13I12	ACAGCAGGAAACAAGAAGC	TTGAGTGCTTGAAAGGGAT
F1 P2	ATGTTGTGATGAGCGGGTAG	GCGTTTGCGGTATCGTTT
T23J7	TCGTCTAGTTTTTCGAGGCTC	CACATCCACAAAGGGTTAGAG
T24C20-1	AGGAGGAGTAACCGAAGC	TACCACGGAAATGACAATC
T24C20	CATAATCTAATGGTTTCGTTTGG	GGAAATGGGTTTCAGGGTTT
T8 P19	ATGAGAACACGCAAAAGGA	TGAAAACACTTCCAGCGAT
T22E16	GAACCTCCAAATCAAGCAA	AAATTTGATGGAGCATA

3 讨论

小孢子母细胞在第 6~7 期完成减数分裂、中层细胞在第 6 期开始衰退以及绒毡层细胞从第 8 期开始分化为分泌型细胞是花药发育过程中的

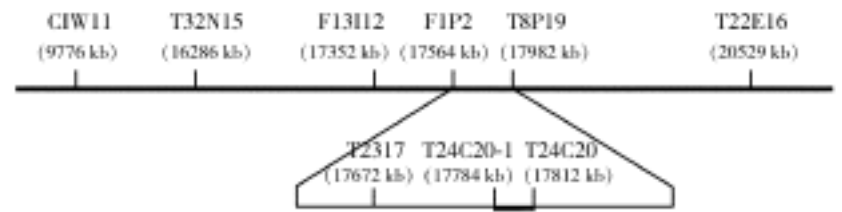


图 3 PMS15-16-2-3 基因定位在第 3 条染色体 BAC 克隆

T24C20 上 28 kb 内。代表基因定位的区间位置

Fig. 3 Genetic mapping of gene PMS15-16-2-3

Location of the gene PMS15-16-2-3

关键事件，一旦出现异常，可能造成雄性不育（Goldberg 等，1993；Sanders 等，1999；Yang 等，2003a, b；Bai 等，1999；Cai 等，2003；Yang 等，1999；Yang 等，2006；Glover 等，1998；He and Mascarenhas，1998）。我们在观察花药的横切面时发现，突变体 pms15-16-2-3 有些小孢子母细胞会发生不正常减数分裂，形成含有 5~6 个小孢子的四分体。我们进一步用压片法观察用荧光染料 DAPI 染色的突变体 6~7 期的花药，发现大多数的四分体含有四个小孢子，仅少数四分体中含有 5~6 个小孢子（数据未显示）。上述结果提示 PMS15-16-2-3 基因的功能可能涉及减数分裂过程。

许多研究已经表明，植物通过细胞壁的胞间通讯，可能在形成位置效应、决定细胞分化命运上具有重要的意义（Berger 等，1994；Wolpert，1996；Ding，1997；Strauss，1998）。在拟南芥药室壁的四层结构中，中层细胞与绒毡层细胞紧密相连。野生型花药的中层细胞在发育的第 6 期开始退化，至第 8 期消失，而绒毡层细胞在中层细胞消失后分化为分泌型细胞，这两个事件关系密切，如果中层细胞不能正常退化，将改变绒毡层细胞的发育命运。已报道的控制拟南芥绒毡层细胞发育命运的相关基因如 AMS（Sorensen 等，2003）和 DYT1（Zhang 等，2006），当这些基因发生突变时，中层细胞都不能正常退化，其结果绒毡层细胞的发育命运也发生了改变。我们在观察花药横切面时还发现突变体 pms15-16-2-3 中层细胞的退化以及绒毡层细胞分化为分泌型细胞的过程出现了异常，这一结果提示 PMS15-16-2-3 基因的功能可能与花药中层细胞和绒毡层细胞发育命运有关。

生物信息学分析表明在定位区间内有 8 个基因，其中没有被克隆的不育基因的报道，因此

PMS15-16-2-3 基因是一个新的控制小孢子发育的基因。目前,我们在购买候选基因的突变体,做等位分析和遗传互补实验,准备克隆基因并对基因功能进行进一步的研究。

〔参 考 文 献〕

- Yi Jun (易君), Gao JF (高菊芳), Zhang ZB (张在宝) *et al.*, 2006 . Genetic and mapping analysis of *Arabidopsis thaliana* male sterile mutant ms1502 (Cruciferae) [J] . *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **28** (3): 283—288
- Bai XF, Peirson BN, Dong FG *et al.*, 1999 . Isolation and characterization of SYN1, a RAD210like gene, is essential for meiosis in *Arabidopsis* [J] . *Plant Cell*, **11**: 417—430
- Berger F, Taylor A, Brownlee C, 1994 . Cell fate determination by the cell wall in early Fucus development [J] . *Science*, **263**: 1421—1423
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM, 1991 . Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis* [J] . *Development*, **112**: 1—20
- Cai X, Dong F, Edelmann RE *et al.*, 2003 . The *Arabidopsis* SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing [J] . *J Cell Sci*, **116** (Pt 14): 2999—3007
- Ding B, 1997 . Cell to cell transport of macromolecules through plasmodesmata: a novel signaling pathway in plants [J] . *Trends Cell Biol*, **7**: 5—9
- Estelle MA, Somerville CR, 1987 . Auxin-resistant of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology [J] . *Mol Gen Genet*, **206**: 200—206
- Glover J, Grelon M, Craig S *et al.*, 1998 . Cloning and characterization of MS5 from *Arabidopsis*: a gene critical in male meiosis [J] . *Plant J*, **15**: 345—356
- Goldberg RB, Beals TP, Sanders PM, 1993 . Anther development: basic principles and practical applications [J] . *Plant Cell*, **5**: 1217—1229
- He C, Mascarenhas JP, 1998 . MEI1, an *Arabidopsis* gene required for male meiosis: isolation and characterization [J] . *Sex Plant Reprod*, **11**: 199—207
- Ito T, Shinozaki K, 2002 . The MALE STERILITY1 gene of *Arabidopsis*, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in the tapetal cells and is required for pollen maturation [J] . *Plant cell Physiol*, **43**: 1285—1290
- Kaul MLH, 1988 . Male Sterility in Higher Plant (Monographs on theoretical and applied genetics, vol (10) [M] . Springer Verlag Berlin
- Regan SM, Moffatt BA, 1990 . Cytochemical analysis of pollen development in wild-type *Arabidopsis* and a male-sterile mutant [J] . *Plant Cell*, **2**: 877—889
- Sanders PM, Bui AQ, Goldberg RB, 1999 . Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants [J] . *Sex Plant Reprod*, **11**: 297—322
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM, 1990 . Early flower development in *Arabidopsis* [J] . *Plant Cell*, **2**: 755—767
- Sorensen AM, Unte US, Huijser P *et al.*, 2003 . The *Arabidopsis* ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor [J] . *Plant J*, **33**: 413—423
- Strauss E, 1998 . When wall can talk, plant biologist listen [J] . *Science*, **282**: 28—29
- Sun Y, Zhang W, Li FL *et al.*, 2000 . Identification and genetic mapping of four novel genes that regulate leaf development in *Arabidopsis* [J] . *Cell Res*, **10** (4): 325—335
- Wilson AZ, Morroll SM, Dawson J *et al.*, 2001 . The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors [J] . *Plant J*, **28**: 27—39
- Wolpert L, 1996 . One hundred years of positional information [J] . *Trends Genet*, **12**: 359—364
- Xin ZG, Velten JP, Oliver MJ *et al.*, 2003 . High-throughput DNA extraction method suitable for PCR [J] . *Biotechniques*, **34**: 1—6
- Yang M, Hu Y, Lodhi Ma H *et al.*, 1999 . The *Arabidopsis* SKP1-LIKE1 gene is essential for male meiosis and may control homologue separation [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 11416—11421
- Yang SL, Xie LF, Mao HZ *et al.*, 2003a . TAPETUM DETERMINANT1 is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther [J] . *Plant Cell*, **15**: 2782—2804
- Yang XH, Makaroff, CA and Ma H, 2003b . The *Arabidopsis* MALE MEIOCYTE DEATH1 gene encodes a PHD-Finger protein that is required for male meiosis [J] . *Plant Cell*, **15**: 1281—1295
- Yang XH, Timofejeva L, Ma H *et al.*, 2006 . The *Arabidopsis* SKP1 homolog ASK1 controls meiotic chromosome remodeling and release of chromatin from the nuclear membrane and nucleolus [J] . *J Cell Sci*, **119**: 3754—3763
- Zhang W, Sun YJ, Timofejeva L *et al.*, 2006 . Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1) encoding a putative bHLH transcription factor [J] . *Development*, **133**: 3085—3095
- Zhang ZB, Zhu J, Gao JF *et al.*, 2007 . Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis* [J] . *Plant J*, **52**: 528—538
- 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 [J] . *Genes Dev*, **16**: 2021—2031
- Zheng Z, Xia Q, Dauk M *et al.*, 2003 . *Arabidopsis* AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility [J] . *Plant Cell*, **15**: 1872—1887