

# 张大兵

(1967年7月5日-2023年6月22日)

袁政, 石建新, 杨立桃, 黄国强, 梁婉琪

上海交大学生命科学与技术学院, 杂交水稻国家重点实验室, 代谢与发育科学国际合作联合研究室

## 摘要

我们对张大兵教授的离世表达最深切的哀悼, 他是我们敬爱的导师、同事和朋友。张大兵教授是《Seed Biology》编委, 享年 56 岁。他是上海交通大学讲席教授、阿德莱德大学教授、阿德莱德大学-上海交通大学植物科学与育种联合实验室主任。他的研究主要集中在谷物发育领域, 包括鉴定生殖器官、雄性生殖以及环境响应(包括温度、光周期、机械信号等)的新调控因子, 以及转基因生物安全评估。张大兵教授留下了一支敬业的团队及众多的同事和朋友。

张大兵, 江苏淮安人, 1967 年出生于一个农村家庭, 在其成长过程中曾积极参与农事活动。这样的人生经历塑造了他从事农业研究的职业道路, 专注于作物的生殖发育和生物安全。尽管 25 年的职业生涯相对较短, 张大兵教授在多个研究领域做出了重要且多样化的贡献, 涵盖花序发育和小穗形态的确定、植物雄性生殖及其对环境的适应性、细胞骨架动态和植物形态发生对环境信号的响应、及食物和饲料中转基因生物(GMO)成分的分子表征和检测。2018 年世界科学院(TWAS)为其颁发了农业科学奖, 以表彰他在了解高等植物特别是在水稻的花序、花朵和花药形态发生分子机制的重要贡献。

这篇纪念文章全面总结和整理了张大兵教授的科学成就, 为这些领域今后的发展奠定基础。

## 花序、小穗和花朵的发育和属性建立

生殖发育是植物生命周期中至关重要的一步, 直接影响农作物的产量[1-3]。因此, 调控花、小穗和花序发育的分子机制一直是植物学家和作物学家广泛关注的焦点(图 1a)。经典的 ABCDE 花器官发育模型, 即“四聚体模型(quartet model)”, 是基于对拟南芥、金鱼草和矮牵牛等双子叶植物的研究提出的。根据这个模型,

花器官的最外轮（萼片）的建立和发育受 A 类基因调控，第二轮（花瓣）由 A 类和 B 类基因共同调控，第三轮（雄蕊）由 B 类和 C 类基因调控，第四轮（心皮）由 C 类基因调控。此外，C 类和 D 类基因冗余地参与了心皮内胚珠的形成和发育，而 E 类基因参与了花的属性决定，并参与了每一轮花器官的形成和发育[4,5]。

随后的生物化学和分子生物学研究已经阐明了 ABCDE 模型的分子基础，提出由 A-E 类基因编码的 MADS-box 蛋白形成特定的四聚体来调节靶基因的表达，从而对每轮花器官的形成和发育加以调控。值得注意的是，E 类蛋白质作为分子“胶水”，可以与 A、B、C 和 D 类蛋白质形成四聚体[6]。

与典型的双子叶植物花器官不同，禾本科植物的花朵在最外层具有内稃和外稃，其特征和起源仍然是一个有争论的话题，由此产生了单双子叶植物花器官同源性起源的一些问题。

张大兵教授团队围绕模式禾本科植物--水稻的花序和小穗发育的遗传和生化基础开展了系统的研究。野生型水稻小穗含有一个顶端小花伴随着两个轮生的附属器官，包括退化颖片和不育外稃（图 1b）。水稻小花由一个外稃、一个内稃、外稃旁的两个浆片、六个雄蕊和一个雌蕊组成。

张大兵教授和他的研究组利用 EMS 诱变和  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线照射，构建了一个水稻突变体库[7]。研究组成员利用这个突变体库的丰富资源，克隆和研究水稻 B, C, D 和 E 类直系基因的功能，并阐明其他转录因子（TF）在水稻小花发育中的作用(图 1c)。

#### 花器官数目控制基因 *FON4*

*Floral organ number 4 (fon4)* 突变体表现出花器官和花序分支数目增加。这种表型是由于小分泌蛋白 FON4（拟南芥 CLVATA3, CLV3, 的直系同源蛋白）突变引起的枝顶端分生组织（SAMs）增大所致；CLV3 和 FON4 营养和生殖发育期间通过抑制分生组织大小起作用，意味着在水稻和拟南芥中存在保守的 CLV 类途径[8]。虽然 *FON4* 转录物主要积累于 SAMs 顶端的特定细胞群中，但用 FON4 肽处理不影响根尖分生组织(RAM)的生长。这与 CLV3 效应有所不同，表明拟南芥 CLV3 和 水稻 FON4 的 CLV3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (ESR)-related (CLE) 基序存在一些功能分化。

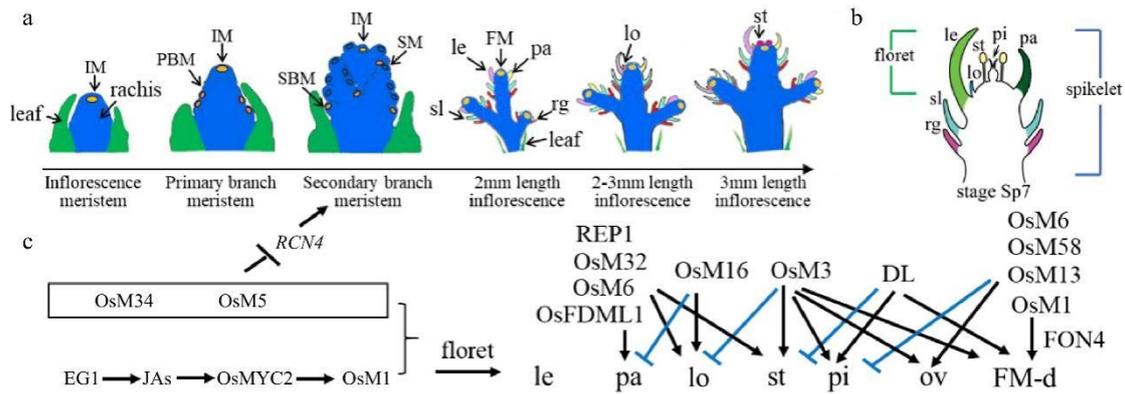


图 1. 水稻花序与小穗发育。(a) 从花序分生组织到雄蕊阶段的水稻花序发育的示意图，显示注释的叶细胞(绿色)，轴细胞(蓝色)，分生组织细胞(黄色)和其他颜色。FM，小花分生组织；IM，花序分生组织；le，外稃；lo，浆片；pa，内稃；PBM，初级分生组织；rg，残余颖片；SBM，次级分生组织；sl，不育外稃；SM，小穗分生组织；st，雄蕊；pi，雌蕊。(b) 水稻小穗的示意图，包括两个不育的外稃和不发育的颖片、一个小花。(c) 由张大兵教授团队克隆和研究的基因。黑色代表正调节或激活，而蓝色代表负调节或抑制。JA, 茉莉酸；OsM, OsMADS；ov: 胚珠；FM-d: 花分生组织决定。

张大兵教授研究组与荷兰拉德堡德大学 Jian Xu 教授合作，发现水稻 FON2-Like CLE PROTEIN2(FCP2p)通过抑制水稻 *QUIESCENT-CENTER-SPECIFIC HOMEBOX (QHB)* 基因的表达，终止 RAM 活性并破坏后期次生木质部形成。*QHB* 是拟南芥 *WUSCHEL (WUS)-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)* 的同源基因，其在静止中心和后期次生木质部细胞的表达受到影响。值得注意的是，这种调控网络在拟南芥中是保守的，为 CLE-WOX 信号在 RAM 维持和维管组织发育中的作用提供了一个新的视角。

最近的一项研究发现，*FON4* 与 C, D 和 E 花同源异型基因共同决定了花发育中的 FM 活性[10]。此外，中国水稻研究所钱前研究组的研究表明，*FON4* 可能与其他互作因子，包括 *HD-ZIP III TF LATERAL FLORET 1 (LF1)*、*YABBY TF TONGARI-BOUSHII (TOB1)*、*AP2 TFs MALE AND FEMALE STERILITY1 (MFS1)*、*SUPERNUMERARY BRACT (SNB)*、*MADS TF OsMADS22* 等协同作用。这些相互作用有助于调节水稻小穗分生组织的有限性生长和单个小花小穗的维持[11]。因此，这些发现为研发多花小穗水稻品种的培育提供了契机。

### 编码 MADS-box 同源结构域转录因子的基因

通过发现由水稻花同源异型基因 *OsMADS3*(C 类)，*OsMADS13*(D 类)和 *DROOPING LEAF (DL)*，一个 YABBY 转录因子)之间的相互作用，揭示了决定水

稻花分生组织的复杂调控网络，以确定胚珠和花分生组织的属性。*OsMADS3* 还和 *DL* 一起终止花分生组织，而 *DL* 和 *OsMADS13* 可能在相同的途径中起作用，以确定心皮/胚珠和花分生组织的属性[12]。

*AGAMOUS-LIKE6(AGL6)* MADS-box 基因 (*OsMADS6* 和 *OsMADS17*) 以及 LOFSEP (*OsMADS1*, *OsMADS5* 和 *OsMADS34*)和 SEP3(*OsMADS7* 和 *OsMADS8*) 进化枝的 E 类基因，是水稻分生组织活性的关键调控基因。*OsMADS6* 正向调节 *OsMADS7*, *OsMADS8*, *OsMADS3*, *OsMADS16/SUPERWOMANI(SPWI)* 和 *OsMADS58* 的表达。此外，*OsMADS6*、*OsMADS1*、*OsMADS13* 和 *DL* 冗余地调节花分生组织活性和属性，组合双突变体产生了无限生长的花分生组织[13,14]。然而，为什么出现这么多冗余的 E 类基因，以及它们是否在分生组织活性中具有特定的功能，仍有待阐明。

### **E 类 MADS-box 转录因子在花和花序发育中的作用**

最近的研究发现大麦中的 *HvMADS1* 在高温条件下可以抑制花序分枝，以保持花序（穗）的形态。*Hvmads1* 突变体的穗低温下不分枝，而高温下则出现分枝。进一步的研究表明，在高温条件下 *HvMADS1* 促进 *cytokinin oxidase/dehydrogenase 3 (CKX3)* 的表达，其编码的蛋白质可以降解细胞分裂素。在 *Hvmads1* 突变体中，高温会减少 *CKX3* 表达，导致细胞分裂素水平升高，从而促进分枝的发生。在高温条件下会 *CKX3* 基因敲除会产生类似的穗分枝表型。这一发现提供了禾本科作物花序分枝变异与温度条件之间关联的有力证据。然而，*MADS1* 调控水稻和其他禾本科植物中细胞分裂素含量机制的保守性和生物学重要性仍不清楚。

张大兵教授团队的研究进一步证实了水稻 E 类 LOFSEP 基因 *OsMADS1*、*OsMADS5* 和 *OsMADS34* 的功能分化。对 *OsMADS1* 和 *OsMADS34* 的功能和遗传互作的研究发现这些基因共同调控水稻花器官，包括外稃、内稃、雄蕊和雌蕊，的发育[16,17]。相比之下，*OsMADS5* 的等位突变体呈现出较弱的表型，暗示该基因在小穗发育中可能起到较小的作用。张大兵教授团队构建了 *Osmads1/5/34 (lofsep)* 三重突变体以及所有可能的双突变体组合，观察到在 *lofsep* 单突、双突和三突变体中，小穗逐渐转化为类叶状结构的现象，而这种转化呈剂量依赖性[18]。这些对水稻小穗性状重叠调控和花分生组织测定的遗传学和分子学研究结果表明，与双子叶植物不同，禾本科中的 LOFSEP 基因通过转录激活 B, C,

AGL6 和 SEP3 类基因来调控小穗器官内三轮的发育。此外, 研究还表明 LOFSEP 和 SEP 蛋白具有同样的保守特征, 能够与其他 MADS-box 蛋白相互作用形成复合体。

最近的研究进一步揭示 *OsMADS5* 和 *OsMADS34* 在水稻花序发育中的协同调控作用。*OsMADS34* 在花序发育的早期阶段积累, 而 *OsMADS5* 的表达在第四阶段 (In4) 发育时开始。*OsMADS5* 在次级分枝和花原基中表达较高, 并与 *OsMADS34* 的表达区域有明显的重叠。分子实验证实了 *OsMADS5* 和 *OsMADS34* 直接结合到 *RCN4* 启动子上, 共同抑制 *RCN4* 的表达。这个过程限制了小穗的分枝, 同时促进了花原基特征的转化[19]。

### 与植物激素茉莉酸的互作

对于产生额外稃片表型的两个突变体的鉴定和表型分析揭示了水稻小花起始和属性建立中涉及的一条新的信号通路[20]。*extra glume1-3 (egl-3)* 和 *eg2-1D* 单突变体中的异常小穗表现出花器官的属性和数量的改变。此外, *egl-3* 和 *eg2-1D* 的双重突变体在单个小穗中生长出额外的异位花原基、颖片结构或双倍的花原基, 表明花原基的分化出现异常。

EG1 是参与茉莉酸(JA)生物合成的脂肪酶, 而 EG2 (也称为 *OsJAZ1*) 是 JA 响应的抑制子, 并与 JA 受体 *OsCOI1b* 相互作用。张大兵教授组的研究结果表明, JA 的含量和信号转导通过激活 *OsMADS1*、*OsMADS7* 和 *OsMADS8* 的表达在小花发育中起着至关重要的作用。这个途径也被其他研究小组进一步证实, 他们发现, 参与 JA 生物合成(*OsPEX5* 和 *OsOPR7*)[21]、JA 受体(*OsCOI1a* 和 *OsCOI1b*)[22] 和 JA 响应基因(*OsMYC2*)[21]均参与调控小花的发育。尽管遗传分析表明 *OsMADS1* 和 *OsMADS3* 对于维持花分生组织活性和器官属性确定至关重要, 且 *OsMADS1* 和 *OsMADS58* 在调节花分生组织决定性和抑制小穗分生组织逆转中非常重要[23], 但水稻 *OsMADS1* 调节小花分生组织属性的确切机制仍不清楚。

### 单双子叶植物轮生花器官属性的解析

由于拟南芥和水稻中 B 类和 C 类基因的功能高度保守, 张大兵教授团队的研究模型为: 水稻的内稃是拟南芥萼片的对应物, 而水稻的外稃则是拟南芥苞片的对应物 [24]。这个观点与 *LONG STERILE LEMMA (GI)*[25], 也称为 *ELONGATED EMPTY GLUME (ELE)*[26]的研究结果一致, 并且得到 LF1 决定不

育外稃属性功能的进一步支持[27]。与 B 类(*OsMADS16/SPW1*)或 C 类(*OsMADS3*、*OsMADS58*)基因的单一突变体相比,双重突变体组合 *spw1-1 osmads3-4* 和 *spw1-1 osmads58* 在野生型雄蕊的位置上生长出一个额外的由六个类颖片结构组成的花器官轮,确认了水稻中 B 类和 C 类基因在抑制花原基,特别是在第三轮花器官原基无限生长调控中的关键作用。

最近的单细胞 RNA 测序分析研究了水稻小花和花序分生组织的发育轨迹。揭示内稃和外稃的细胞转录组图谱之间存在显著差异。此外,研究也证实一个完整的水稻花是由内稃,浆片,雄蕊和雌蕊组成[28]。总之,上述遗传和分子证据明确了不育外稃和外稃之间的同源性,证实了它们都具有“苞片”属性。此外,内稃被确定水稻小花内的一个萼片状结构。内稃独特属性的建立及其形态发生的机制值得进一步研究。

现有证据表明, MADS 转录因子 *OsMADS15*、*OsMADS32*、*OsMADS6* 以及 TCP 转录因子 *REP1* 可能在调控水稻内稃形态发生中发挥重要作用。一些突变体,如 *degenerative palea (dep)/Osmads15*、*retarded palea1 (rep1)*和 *depressed palea1 (dpl)*等表现内稃主体部分(BOP)的发育延迟甚至停滞,而内稃边缘区域(MRP)发育正常[29–31]。*chimeric floral organs1 (cfo1)/Osmads32* 突变体 MRP 转化为 BOP[32,33]。*mosaic floral organs1 (mfo1)/Osmads6* 突变体中,MRP 转化为 BOP 并向外扩张,产生了具有五个维管束的外稃类器官。*OsMADS6* 直接调控 *FACTOR OF DNA METHYLATION LIKE 1 (OsFDML1)* 的表达,而 *Osfdml1* 突变体的内稃类似于 *mfo1/Osmads6* 突变体的内稃。过表达 *OsFDML1* 或 *OsMADS6* 的转基因植物的内稃发育异常,其特征是 BOP 和 MRP 之间的界限缺失[34]。这种嵌合结构导致 BOP 异位生长,表明 MRP 可能限制 BOP 的生长。这些结果表明,水稻内稃的发育,特别是 MRP 的发育受到精细的调控,其特殊的分子机制值得进一步研究。

## 植物雄性生殖及其对环境的适应

发生在雄蕊中的植物雄性生殖对于开花植物的成功结实至关重要。雄蕊由花药和花丝组成;花药产生花粉,而花丝将花药与中央花轴连接,并为其提供水分和养分通道。雄蕊的发育始于花原基,形成花丝和花药。花药中的分生组织通过

细胞分裂和分化成为花粉母细胞，最终产生雄配子体（花粉）和最终包围花粉的多个细胞层的花药壁（表皮、内层、中层和绒毡层）。可育花粉的发育及其从花药中的释放是一个复杂的过程，受到严格的调控，并在拟南芥和水稻等模式植物中保守[35-37]。花粉的成功发育和最终从花药中释放需要花药体细胞层的及时形成和退化以及他们与发育中的花粉之间的顺畅交流[36]。其中一个关键的花药体细胞层是绒毡层，它在减数分裂过程中通过程序性细胞死亡（PCD）退化，为花粉壁的形成和细胞内淀粉和脂类积累提供结构和营养成分，也为花粉发育提供信号分子[35,38-40]。在绒毡层的 PCD 过程中，小孢子形成初级外壁，为花粉壁前体的沉积和组装提供模板，最终形成复杂的三层花粉壁：外壁、内壁和花粉外壁（也称为含油层）[38-40]，以保护成熟的花粉。

张大兵教授使用包括遗传学、生物化学、分子学、解剖学和细胞学方法在内的综合方法，对水稻和拟南芥雄性生殖发育的分子机制进行了系统研究，并做出了重要贡献(图 2)。

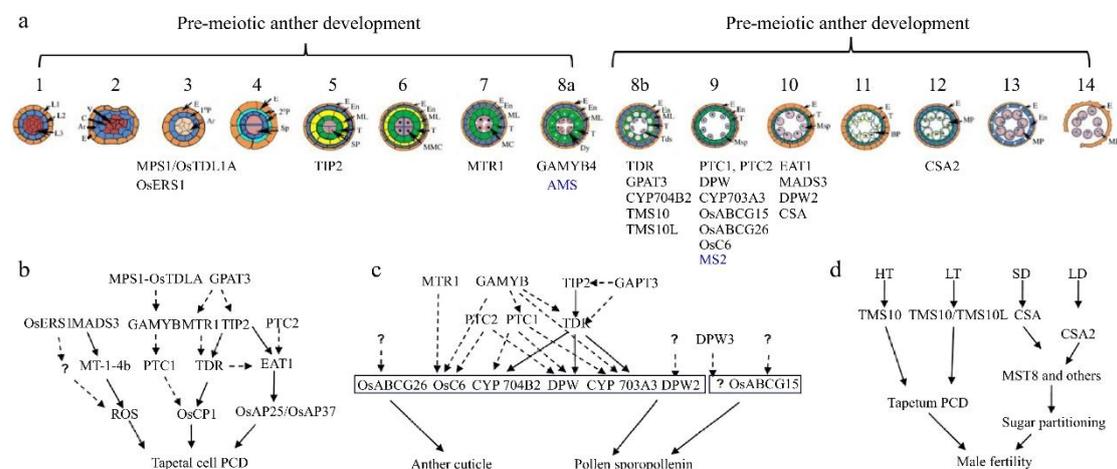


图 2. 花药和花粉的发育及其对环境的适应。(a)单双子叶植物花药发育的示意图。张大兵教授鉴定的在花药发育中起作用的基因已在图中标注(蓝色字体的是拟南芥基因，黑色字体的是水稻基因)。(b)花药发育的调控网络。(c)由张大兵教授鉴定的与水稻绒毡层细胞程序性死亡和花药角质层及花粉孢粉素发育有关的途径和网络。实线箭头表示从生化结合分析中获得的信息，而虚线箭头表示从转录分析中获得的数据，问号表示该部分尚待阐明。(d)张大兵教授鉴定的两个分子对，TMS10/TMS10L 和 CSA/CSA2，分别介导水稻对高/低温(HT, LT)和长-短日长(LD, SD)的反应。

## 减数分裂前的花药发育

分生组织细胞的胞内通讯和分化对于减数分裂前的花药发育和随后的花粉形成至关重要，但其潜在的分子机制大部分仍然不清楚。在这一领域中，2012年张大兵教授的团队揭示了一种定位于质膜的水稻簇形糖蛋白，MICROSPORE AND TAPETUM REGULATOR1 (MTR1)，在孢子体细胞和生殖细胞之间的通讯中发挥关键作用。雄性生殖细胞分泌 MTR1，它作为一种细胞外粘附分子，调节生殖细胞与相邻体细胞之间的细胞间通讯[41]。

在 2016 年，他的研究揭示了 MSP1 (MULTIPLE SPOROCYTE1)，一种细胞表面定位的富含亮氨酸重复受体激酶 (LRR-RLK)，在确定早期花药细胞命运中的作用。MSP1 与其配体 OsTDL1A (TPD1-like 1A) 相互作用，从而决定花药壁层细胞和小孢子母细胞的属性；单突变体和双突变体花药缺乏中层和绒毡层细胞，并具有更多的小孢子母细胞。MSP1 和 OsTDL1A 通过 TGACGTCA 顺式作用元件结合蛋白 OsTGA10 和植物特有的 CC 型谷胱氧还蛋白 OsGrx\_I1 从而调节氧化还原状态来发挥作用[42]。

在 2018 年，张大兵教授团队还阐明了胞质和线粒体定位的 glutamyl-tRNA synthetase (GluRS), OsERS1, 在花药细胞分裂和形态建成中的关键作用。OsERS1 通过影响蛋白质合成、氨基酸代谢和细胞氧化还原平衡来履行其调控功能[43]。另一个值得注意的是 TDR INTERACTING PROTEIN2 (TIP2)，一种 bHLH 蛋白，它可以直接调控另外两个 bHLH 基因，*Tapetum Degeneration Retardation (TDR)* 和 *ETERNAL TAPETUM 1 (EAT1)* 的表达。TIP2 还与 TDR 发生相互作用，影响花药的后期发育，表明这三种 bHLH 基因在决定花药发育过程中不同细胞类型的不同步骤中起着中心作用[44]。这些结果揭示了一个重要的生物学谜团，即控绒毡层细胞和小孢子母细胞属性决定及两者之间的沟通交流机制[45]，为通过改良减数分裂前的花药发育及植物育种奠定了坚实基础。

## 减数分裂后花药发育

### 绒毡层 PCD

在开花植物中，绒毡层细胞的程序性细胞死亡 (PCD) 触发了其在花粉发育后期阶段的退化过程，以提供花粉壁形成和花粉成熟所需的营养和结构物质及信号分子。张大兵教授团队的研究成果显著丰富了我们对于植物绒毡层细胞 PCD 调控的分子基础的理解。他的团队分离和表征了几个重要的调控绒毡层细胞 PCD

的转录因子，包括：

TDR, 通过直接靶向 OsCP1(一种半胱氨酸蛋白酶)和 OScp6(一种蛋白酶抑制剂)来促进绒毡层细胞 PCD[46]，同时，TDR 对于脂质代谢和水稻花粉发育等几种基本生物过程也很重要[47]；

EAT1, 是 TDR 相互蛋白，作用在 TDR 下游，通过直接调节天冬氨酸蛋白酶 OsAP25 和 OsAP37 表达来促进绒毡层 PCD[48]；

MADS3, C 类蛋白, 通过调节 ROS 去除蛋白 MT-1-4b 编码基因的表达和相关代谢途径，调节花药活性氧(ROS)平衡，进而调控绒毡层 PCD[49,50]；

PTC1, PERSTENT TAPETAL CELL1, 一种植物同源结构域(PHD)-指状蛋白，以未知方式促进绒毡层坏死样细胞死亡[51]；

PTC2, 核定位的 AT-hook 蛋白，与 PTC1 一样，其调控绒毡层 PCD 的机制尚不清楚[52]。

值得注意的是，尽管上述转录因子调控绒毡层 PCD 详细的分子基础并没有全部得到阐明，但这些研究突出了它们在花药和花粉发育中的重要作用，也丰富了对植物雄性生殖的认识(图 2b)。

### 花药角质层和花粉孢粉素的形成

张大兵教授团队对植物生殖生物学的最大贡献之一就是系统阐明了调节两个重要的花粉保护层（花药角质层和花粉孢粉素）的生物合成、修饰、运输和组装的基因和遗传调控网络。他和他的团队鉴定并表征了许多参与其中的编码相关酶、转运蛋白和转录因子的基因(图 2c)。

#### 脂质前体的生物合成

张大兵教授关于水稻 *Defective Pollen Wall (DPW)* 的研究首次揭示了脂肪醇在花药角质层和花粉孢粉素生物合成中的关键作用。质体定位的 DPW 将脂肪酸转化为脂肪醇，以促使它们从质体输出，并结合到角质层和孢粉素中[53]。在拟南芥中的工作也证实了这种质体中 DPW 介导的脂肪醇合成途径在单双子叶植物中是保守的[54]，突出了脂肪醇在雄性生殖发育中的重要作用。他的另外一项工作揭示了 DPW3 (alpha integrin-like 蛋白) 在花药角质层和花粉孢粉素发育过程中的作用，DPW3 主要影响初生外壁基质形成、质膜波动、胼胝质壁沉积和乌氏体形成[55]。

从水稻  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线辐射产生的突变体库中鉴定到的内质网定位的 OsGPAT3 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 3), 为甘油酯生物合成酶在雄性生殖中的功能提供了新的见解。OsGPAT3 是单子叶特有的, 在雄性生殖中发挥着和双子叶植物同源蛋白不同的作用; *osgapt3* 突变体显示有缺陷的花药角质层, 异常的绒毡层发育和退化, 退化的花粉、有缺陷的外壁和完全雄性不育[56]。

#### 脂质前体的修饰

张大兵团队对水稻中编码两个细胞色素 P450 家族成员蛋白基因的分离和表征, 使人们认识到脂质修饰在花药角质层和花粉孢粉素生物合成中的重要作用。CYP704B2 催化  $\omega$ -hydroxylated fatty acids 的产生, 在植物雄性生殖发育方面, 这个功能从苔藓到被子植物中均保守[57]。CYP703A3 是一种链内羟化酶, 仅催化月桂酸, 并主要产生 7-羟基月桂酸, 表明该途径对雄性生殖发育的重要性;有趣的是, TDR 直接调节 *CYP703A3* 的表达[58]。这两个 P450 基因突变体的花药角质层和花粉孢粉素生物合成均有缺陷, 表现出雄性不育[57,58]。

#### 脂质前体的运输

张大兵教授团队的工作还鉴定到水稻中两种类型的转运蛋白参与绒毡层中产生的各种代谢物在不同的花药组织之间的分配。其中一种转运蛋白是植物脂质转运蛋白(LTP)OsC6。这种单子叶植物特有的蛋白具有脂质结合活性;是脂质小体(Ubisch)形成、花药角质层和孢粉素生物合成不可或缺的, 并直接受到 TDR 调节的[59]。其他类型的转运蛋白是 ATP 结合盒 G 家族成员 OsABCG26 (拟南芥 ABCG15 同源蛋白) 和 OsABCG15 (拟南芥 ABCG11 同源蛋白)。OsABCG26 和 OsABCG15 通过影响绒毡层细胞脂质前体的转运来协同调节水稻雄性生殖:OsABCG26 转运脂质参与花药角质层和孢粉素形成;而 OsABCG15 转运脂质主要参与孢粉素形成[60,61]。

#### 脂质前体的组装

张大兵教授团队对 DPW2(cytoplasmic hydroxycinnamoyl-CoA: $\omega$ -hydroxy fatty acid transferase)的功能表征结果显示芳香族脂肪酸对脂质前体的组装形成花药角质层和花粉孢粉素也是必不可少的, 同时表明 DPW2 通过聚合脂质前体形成花药角质层和花粉孢粉素, 参与植物生殖发育[62]。这项工作也强调了芳香族脂肪酸和脂肪族脂肪酸在雄性生殖中具同等作用。

### 花药糖分分配

张大兵团队对水稻 CSA(Carbon Starved Anther)的功能表征发现,库源组织之间的糖分配对于花药发育和雄性繁殖非常重要。CSA(R2R3 MYB 转录因子)直接调节编码单糖转运蛋白基因 MST8 的表达,表明 CSA 是调节水稻雄性生殖发育中糖分配的关键转录因子[63]。值得注意的是,植物激素油菜素内酯(brassinosteroid, BR)可通过直接调节 CSA 的表达,促进水稻的花粉和种子发育,这个结果将 BRs 直接连接到植物生殖中的糖分配[64]。

### 花药和花粉发育的调控

#### 转录调控

张大兵教授团队鉴定到许多重要的参与调节植物雄性生殖发育的转录因子(图 2b, 2c), 包括:

TIP2, 单独调控减数分裂前的花药发育, 如与 TDR 一起则调控花药的晚期发育[44];

TDR[46,47], EAT1[48], MADS3[49], PTC1[51]和 PTC2[52], 参与绒毡层 PCD;

CSA,参与糖分配[63];

GAMYB, 一种受赤霉素(GA)诱导的 TF, 和 UNDEVELOPED TAPETUM 1 (UDT1)一起, 参与调控水稻花药早期发育[65]。*msp1-4* 突变中, UDT1 和 *GAMYB* 表达量降低, 这意味着 MSP1 可能在雄性生殖发育中作用于 *UDT1* 和 *GAMYB* 的上游[68];

AMS (ABORTED MICROSPORES), 是拟南芥中 TDR 的同源物, 是一种参与绒毡层和花粉发育的 bHLH 转录因子。AMS 能直接调控参与花药角质层和花粉孢粉素形成的相关基因, 并与其他两种 bHLH 蛋白 (AtbHLH089 和 AtbHLH091) 以及 ATA20 蛋白互作, 形成复合体来共同调控花药和花粉的发育 [66,67]。

### 从基础研究到育种进展

张大兵教授的工作不仅丰富了我们对于植物雄性生殖生物学的理论认识, 而且对改良杂交水稻育种做出了重大贡献, 杂交是大幅度提高水稻产量的最有效策略。

## 温度适应

在水稻中，张大兵教授团队发现了一个控制植物雄性生殖适应变化温度的分子，并揭示了植物控制生殖发育响应环境的新分子机制。该分子对由两个 LRR-RLKs (TMS10 及其同源 TMS10L) 组成，在常温下，两者冗余地维持花药和花粉发育(图 2d)。高温下，TMS10 维持正常雄性生殖；在低温下，TMS10 和 TMS10L 共同维持正常雄性生殖[69]。这项工作为开发新的水稻杂交制种系统提供了有益的遗传资源。

## 光周期适应

张大兵教授团队还发现了另一个水稻雄性生殖响应光周期的基因 CSA2(图 2d)。这项研究表明，水稻进化出至少两个 MYB 蛋白，CSA 和 CSA2，分别调控短日照和长日照条件下糖从源组织(叶)到库组织(花药)的分配[70]。在比较不同光周期下 CSA 突变体与野生型(WT)叶片和花药的转录组学特征后，确定了 CSA 直接靶向的八个参与糖代谢和运输的基因[71]。

为了进一步获得影响水稻花粉成熟响应不同光照的关键基因和调控网络，张大兵教授团队对白天不同时间收集的 stage11 花药进行了转录组学分析，创建了一个新的资源，用于鉴定调节环境敏感雄性生殖发育的基因，以用于水稻改良[72]。

这些研究不仅揭示了光周期变化影响雄性育性的分子机制，也为抗逆水稻育种提供了遗传资源。为了克服目前依赖雄性不育系的杂交水稻技术存在的内在问题，张大兵教授团队将 *csa* 突变引入籼稻和粳稻，分别在两个品种中创建了短日条件不育，但长日条件下可育的品系。最重要的是，*csa* 和恢复系 JP69 杂交产生的 F1 植株显示出杂交活力，使得建立一个稳定的两系杂交系统成为可能，这一进展对农业发展可能产生重大影响。

## 细胞骨架与水稻发育和环境响应的新认识

由于器官形态的差异，被子植物的结构呈现出显著的多样性。单个植物器官的形状是由其内部细胞的形状和结构决定的，由微管和微丝细胞骨架系统维持其特殊的形态。植物细胞骨架主要由微管和肌动蛋白丝组成，是一种高度动态变化的结构。已有的研究揭示了细胞骨架在各种细胞内过程中的关键作用，例如细胞

分裂、运动、形态发生和信号转导。

张大兵教授及其研究团队使用正向遗传筛选法鉴定出一种表现为水稻株型异常的突变体，其特征表型包括株高降低、根部弯曲、种子缩小等（图3）。突变基因名为 *Rice Morphology Determinant* (*RMD*, *Os07g0596300*)，编码一种 II 型 *formin* 蛋白，是水稻中第一个经过功能验证影响发育的 *formin* 蛋白。作为一个与肌动蛋白结合的蛋白，它调节维管蛋白和肌动蛋白丝动态，作为细胞器和细胞骨架之间的支架[74,75]。这些发现深化了我们对 *RMD* 参与决定茎和根体系结构、花粉管伸长、光调节茎部重力响应和茎中次生细胞壁形成等方面的认识，显著推进了对细胞骨架在水稻发育和对环境胁迫响应中的贡献的理解。团队目前正在此方向继续努力，预计将取得更多的突破。

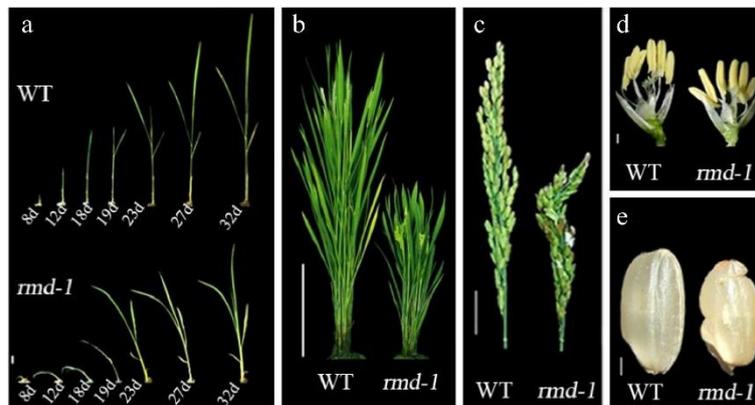


图 3. 与野生型(WT)植物相比, *rmd* 突变体表现出多效性缺陷[75]。(a) 幼苗, bar = 8mm。(b) 抽穗期的水稻植株; bar = 20cm。(c) 抽穗期植物的圆锥花序和轴; bar = 2cm。(d) 抽穗期植株的代表花朵, bar = 2mm。(e) 种子; bar = 2mm。

### RMD 在花粉管生长中的作用

花粉管在被子植物中充当将精子输送到胚珠的通道，促进双重受精。张大兵教授及其同事阐明了 *RMD* 促进花粉管生长中微丝排列的分子机制。*RMD* 功能丧失会阻碍花粉管在离体和体内的萌发和生长速率。*RMD* 在水稻花粉管顶端的定位对促进花粉管生长起至关重要的作用，它通过建立极性和组织 F-肌动蛋白来促进花粉管的生长。*rmd* 突变体显示出不规则的 F-肌动蛋白模式，顶端肌动蛋白密度和轴部纵向肌索排列被破坏。由 *RMD* 引导的 F-肌动蛋白阵列的定向和特性对细胞壁成分（例如果胶）的沉积以及细胞质流动的模式和速度都具有关键影响[76]。该研究证明了 *RMD* 在调控 F-肌动蛋白阵列的组织 and 定向，从而空间调控水稻花粉管生长中发挥的至关重要的作用（图 4）。

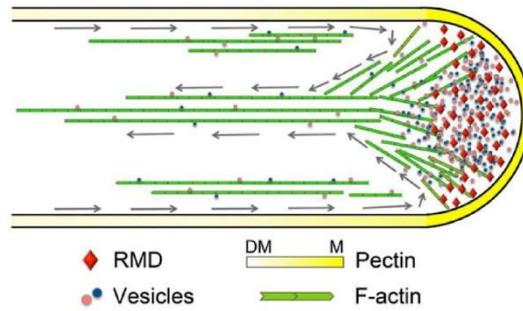


图 4. 描述 RMD 在水稻花粉管生长中作用的模型[76]。RMD 是一个重要的调节因子，在维持细胞质流的空间排列方面发挥重要作用，这对于确定水稻花粉管的果胶分布和随后的尖端生长至关重要。灰色箭头描绘出反向喷泉细胞质流的模式。DM，去甲酯化；M，甲酯化。

### RMD 在对根角响应土壤养分中的作用

根系角度在养分吸收中起着重要作用，特别是对于磷这种倾向于在土壤表层积累的养分。在磷水平降低的情况下，根系倾向于以较浅的角度生长，这会影响植物对低磷耐受性和其他方面的适应能力。因此，鉴定调控根系角度的基因和机制对于植物育种至关重要。张大兵教授与诺丁汉大学的 Malcolm Bennet 教授合作发现，在外部磷含量降低时，*RMD* 的表达水平上调，并且 RMD 定位并连接着与重力感应有关的细胞器（平衡石）。*rmd* 突变体表现出更陡的冠根生长角度，对磷水平不敏感，并且由于平衡石运动更快，展示了更快的重力响应（图 5）[77]。这项研究提供了植物调节重力感应机制的新机制，植物使用该机制能够根据土壤养分的可用性调整根系结构。此外，这项研究还鉴定到了其他一些可以用于植物育种的潜在分子靶点。

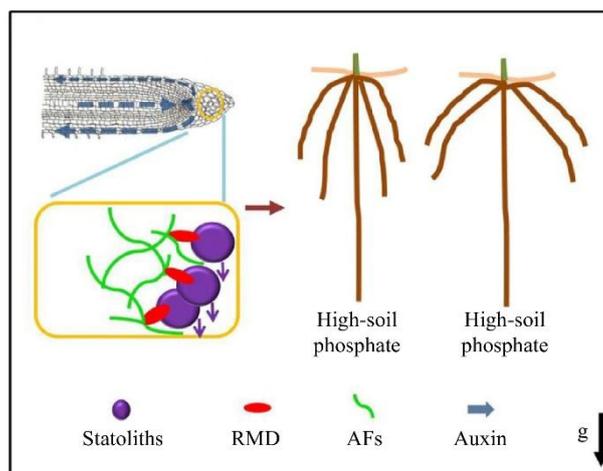


图 5. RMD 依赖的磷调节根冠角度[77]。张大兵教授及其合作者提出了一个模型，即低磷土壤条件下和小柱细胞细胞中更高的 RMD 水平促进了微丝蛋白（AFs）与平衡石之间更强的相互作用，延迟了平衡石的沉降，从而导致了较弱的生长素驱动根重力响应和较浅的冠根角度。相反，在高磷土壤条件下，RMD 水平降低最终导致较陡的冠根角度。

## **RMD 在光信号和重力感知中的作用**

光和重力在植物茎的最佳生长和发育方向中起着至关重要的作用，其物理运动与肌动蛋白细胞骨架和肌动蛋白结合蛋白的组织动态密切相关。然而，肌动蛋白细胞骨架是否参与茎负向重力反应仍是一个悬而未决的问题。

张大兵教授及其团队的研究表明，RMD 促进了水稻茎部肌动蛋白骨架的重组，这种重组与水稻茎部对负重力的响应能力密切相关。具体而言，在光照条件下生长的 *rmd* 突变株的茎表现出向重力性表型，而黄化的 *rmd* 突变株茎表现出典型的负向重力性。此外，该研究证明 RMD 在维持肌动蛋白构型方面起着至关重要的作用，促进感应重力的内胚层细胞平衡石的运动。此外，RMD 确保光照条件下茎中生长素的适当分布，RMD 在黑暗条件茎中生长素的分布并不起作用。RMD 的表达受节律控制，并直接受到 phytochrome-interacting factor-like 蛋白 OsPIL16 的抑制。因此，过表达 OsPIL16 导致重力感知和肌动蛋白排列的缺陷，与 *rmd* 突变体的特征表型非常相似[78]。这些发现为连接光信号和重力感知的复杂机制的提供了有价值的发现，该机制最终有助于水稻茎的直线向上生长。

## **转基因生物的分子特征识别和检测**

自 1996 年以来，中国在开发和批准商业化生产以及广泛应用转基因（GM）作物方面取得了重大进展。尽管如此，转基因农作物及其产品的安全问题已成为公众关注的主要事项。为了解决这个问题，张大兵教授和他的团队对转基因生物风险评估和管理的关键挑战进行了深入的研究。集中在关键领域，包括分子特征的鉴定和分析，建立 GM 含量检测的标准化方法，以及研发适用于现场实际应用的快速、高通量的检测方法。

### **识别和定义给定转基因产品的基因修饰水平**

转基因生物的分子特征包括外源基因的整体插入序列、整合位点、旁侧序列和拷贝数。分子特征鉴定是转基因生物安全性评价的技术核心。张大兵教授系统地运用热不对称交错 PCR（thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR）、染色体步移（genomic walking）和反向 PCR 等技术，对转基因大豆(MON89788)、转基因油菜(T45、Ox235)、转基因玉米(MON863、TC1507、NK603、3272、59122)、

转基因棉花(MON1445、MON531、MON88913、MON15985)和转基因西红柿(华番 1 号)等中国已批准进口或自主研发的转基因作物的整合位点和侧翼序列进行了鉴定。他的团队还开发了基于实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)的外源基因拷贝数检测方法,并将其应用于几种转基因作物拷贝数的检测[86-87]。

2013 年,他率先提出了利用第二代测序技术分析和鉴定全基因组水平的分子特征的 TranSeq 组合[88]。通过构建 pair-end(0.5-0.8 kb)和 mate-pair(~10kb)文库并 paired-end 测序,TranSeq 算法和模型可用于全面和准确地识别转基因生物分子特征[88]。他利用此方法分析了中国主要的转基因水稻品种,如 TT51-1、T1C-19、T2A-1、RJ5、114-7、G281、G6H1 和 PA110 的分子特征,发现在中国已获得安全证书的转基因水稻品种 TT51-1 的 10 号染色体上插入的外源基因有串联重复,在 4 号染色体上有一个新的单拷贝插入[88]。这些信息更新了转基因作物的分子特征数据,在重新获得中国安全评价部门的新批准和美国食品和药物管理局(FDA)和美国农业部的批准方面发挥了重要作用。

#### 研发转基因作物检测的标准化方法

自 1997 年以来,许多国家,如欧盟,日本,韩国和中国,实施了转基因标识制度。为了保证标识制度在中国的顺利实施,张大兵教授团队对转基因产品的定性和定量检测技术进行了广泛的研究。

2004 年,他提出将内源参考基因用于转基因作物的检测。目标参考基因的选择基于种间特异性(特定于一个作物种类)、种内非特异性(特定种的不同品种之间是保守的)和稳定的低拷贝数。确定和验证内源性参考基因的策略如下:

- 1.利用生物信息学分析和筛选候选内源性参考基因;
- 2.设计特异性引物扩增同一物种不同栽培品种的参考基因序列,选择序列相似性高的基因;
- 3.从种间特异性、种内非特异性、拷贝数等角度验证候选基因;
- 4.建立基于参考基因的定性和定量 PCR 检测方法,并组织国际协同实验对所建立的检测方法的性能进行评估。

基于上述策略,张大兵教授团队成功确定和验证了多种作物的内源参考基因,如水稻 SPS[89]、油菜 HMGI/Y[90]、番茄 LAT52[91]、棉花 SadI [92]、木瓜 Chy [93]和小麦 Waxy-D1[94]。

这些定性 PCR 和实时定量 PCR 检测方法用于监测和检测主要转基因事件在中国的存在,如转基因大豆(MON89788, MON87751, A2704-12 和 A5547-127)、转基因油菜(T45, Ox235)、转基因玉米(MON810, MIR604, MON863, TC1507, NK603,3272,59122)、转基因棉花(MON1445、MON531、MON88913 和 MON15985)和转基因木瓜 Huanong 1[79-85; 93,95-98]。张大兵教授还组织了国际协同实验,以验证已开发的方法,并证明这些方法满足转基因检测对定性和定量 PCR 方法的要求[99-102]。这些标准化方法已成功转化为中国的国家标准和国际标准化组织(ISO)的国际标准,并在世界各国广泛应用于转基因产品的检测。

除了建立转基因生物的标准化检测方法之外,他还非常重视开发用于中国转基因成分检测所需的有证标准物质(CRMs),相对于商业化转基因事件的数量,这些 CRM 资源严重不足。他率先提出了“一种作物,一种标准物质”的概念,并为转基因大豆和玉米研发了新的质粒和基因组 DNA 标准[103-107]。这些努力产生了 14 个质粒 DNA 和基因组 DNA 标准物质,可用于在中国商业化应用的 46 个转基因事件的检测。值得注意的是,经他的方法评价过的水稻 TT51(GBW10070),是中国第一个转基因产品的“一级认证标准物质”。这些 CRMs 成功地解决了中国生物安全监督所必需的标准物质的严重短缺问题,也减轻了中国对欧盟和美国标准物质的依赖。

### **推动快速、准确、高通量的 DNA 检测方法**

随着转基因作物商业化的迅速发展,快速筛选和鉴定转基因事件已成为一个挑战。张大兵教授团队开发了几种方法,改善/优化核酸提取、靶标扩增和扩增产物的鉴定,如通用模板 PCR (Universal Template PCR, UT-PCR) [108]、连接通用双探针 PCR (Attached Universal Dual Probes PCR, AUDP-PCR) [109]、基于微滴 PCR 的毛细管凝胶电泳 (Microdroplet PCR Implemented Capillary Gel Electrophoresis, MPIC) [110]、可视化的 LAMP (Visual Loop-mediated Isothermal Amplification, vLAMP) 等[111]。

在 UT-PCR 和 AUDP-PCR 中,使用通用的模板序列和引物产生不同长度的扩增产物,以便进行定量。这些方法用于测定基因拷贝数、病原体负荷、转基因组成和环境样品中的微生物[108-109]。

MPIC 结合了二元引物、微滴聚合酶链式反应和毛细管凝胶电泳(CGE)的优

点，用于分析多个 DNA 靶点。该方法具有良好的特异性和高灵敏度(所有靶点的灵敏度为 0.1%)，成功地从 14 个 GM 事件中扩增出 24 个不同的靶点 DNA 片段 [110]。由于在一个反应中检测到多个目标，因此具有灵活、高通量和低成本的特点。此外，初步结果还表明，MPIC 可用于转基因成分的半定量分析。

对于 vLAMP，他们设计了一个简单的装置，可以在不使用专门的实验室仪器的情况下提取和显示 DNA。该简易 DNA 提取装置由特制的含有硅胶膜的过滤柱和装有海绵过滤器的改良医用注射器组成。样品裂解液过滤、DNA 结合、洗涤和洗脱通过使用注射器施加空气压力进行，从而解除了对离心机的依赖。整个 DNA 提取过程可在 10-15 分钟内完成。改良的 vLAMP 方法在反应混合物中使用微晶蜡包裹的微珠，经 LAMP 扩增后，微珠内的荧光染料可被释放到反应混合物中。释放的荧光染料与 LAMP 扩增的 DNA 结合并改变反应混合物的颜色。该系统快速、简单、有效，可成功地应用于转基因生物体的现场检测，目前中国已采用 vLAMP 技术对港口检验样品和实际现场样品进行快速检测。

为了在全球范围内互认和标准化转基因生物检测方法，张大兵团队构建了一个开放访问的转基因生物检测方法数据库(GMDD)，该数据库收集了几乎所有以前开发和报道的根据不同策略(筛选，基因，构建和事件特异性)分组的转基因生物检测方法[112]。GMDD 还通过事件名称、外源基因或蛋白质信息等方式提供用户友好的检测方法搜索服务。用户可以获得外源整合序列，方便 PCR 引物和探针的设计。值得注意的是，数据库档案包含关于内源性基因、经过认证的标准物质、参考分子和已开发方法的验证状态的各种数据。迄今为止，GMDD 仍然是一个信息丰富的转基因生物检测数据库。

### **将自然变异引入转基因生物的安全评价**

尽管人们普遍认为实质性等同原则适用于转基因生物的安全评价，但在实际的安全评价中如何实施实质性等同原则仍然是一个难题。为了使其在现实中发挥作用，张大兵教授采用了非靶向代谢组学，并将自然变异引入了转基因生物的安全评估。他是第一个为此目的分析了 100 个水稻品种[113]，29 个大豆品种[114]和 14 个玉米自交系[115]的成熟种子代谢组的人。他也是第一个使用这种策略来评估转基因玉米事件 BVLA430101 (过量表达黑曲霉 phyA2) [116]安全性问题的人，他发现只有预期代谢途径中的代谢物水平超出了自然代谢变异的范围，为转

基因生物的安全评估提供了一个很好的参考。

## 结束语

在张大兵教授的科研生涯中，他与国内外众多同事、研究机构和大学建立了持久的合作伙伴关系，并努力促成上海交通大学与英国诺丁汉大学和澳大利亚阿德莱德大学分别签署了本科和研究生双学位联合培养协议。2015年1月23日，在张大兵教授的不懈努力下，建立了阿德莱德大学-上海交通大学植物科学与育种联合实验室。该实验室分别位于阿德莱德大学 Waite 校区的植物研究中心，和上海交通大学闵行校区生命科学技术学院的生命科学楼。联合实验室的主要目标是成为小麦生物学和育种领域的领先机构，展示了澳大利亚和中国之间卓越的合作。以上这些合作以及张大兵教授的出色研究成果，使得上海交通大学在植物科学领域的国际学术影响力大幅增长。此外，他的团队成员们也因此获得了一个很好的国际合作平台，为他们未来的学术追求提供了绝佳机会。

我们对张大兵教授不可估价的贡献表示最衷心的感谢和敬意。

## 利益冲突

作者声明他们没有利益冲突。

## 参考文献

1. Yuan Z, Persson S, Zhang D. 2020. Molecular and genetic pathways for optimizing spikelet development and grain yield. *aBIOTECH* 1:276–92
2. Zhang D, Yuan Z. 2014. Molecular control of grass inflorescence development. *Annu Rev Plant Biol* 65:553–78
3. Zhang D, Yuan Z, An G, Dreni L, Hu J, Kater MM. 2013. Panicle development. In *Genetics and Genomics of Rice*, ed. Q Zhang, RA Wing, 5: 279–95. New York: Springer Number of 279–95 pp.
4. Theissen G. 2001. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* 4:75–85
5. Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljgren SJ, Baumann E, et al. 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424:85–8
6. Gramzow L, Theissen G. 2010. A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biol* 11:214
7. Chen L, Chu H, Yuan Z, Pan A, Liang W, et al. 2006. Isolation and genetic analysis for rice mutants treated with 60 Co  $\gamma$ -Ray. *J. Xiamen Univ. (Natural Science)* 45:82–85
8. Chu H, Qian Q, Liang W, Yin C, Tan H, et al. 2006. The floral organ number4 gene encoding a putative

- ortholog of Arabidopsis CLAVATA3 regulates apical meristem size in rice. *Plant Physiol* 142:1039–52
9. Chu H, Liang W, Li J, Hong F, Wu Y, et al. 2013. A CLE-WOX signalling module regulates root meristem maintenance and vascular tissue development in rice. *J Exp Bot* 64:5359–69
  10. Xu W, Tao J, Chen M, Dreni L, Luo Z, et al. 2017. Interactions between FLORAL ORGAN NUMBER4 and floral homeotic genes in regulating rice flower development. *J Exp Bot* 68:483–98
  11. Ren D, Xu Q, Qiu Z, Cui Y, Zhou T, et al. 2019. FON4 prevents the multi-floret spikelet in rice. *Plant Biotechnol J* 17:1007–09
  12. Li H, Liang W, Yin C, Zhu L, Zhang D. 2011. Genetic interaction of OsMADS3, DROOPING LEAF, and OsMADS13 in specifying rice floral organ identities and meristem determinacy. *Plant Physiol* 156:263–74
  13. Li H, Liang W, Hu Y, Zhu L, Yin C, et al. 2011. Rice MADS6 interacts with the floral homeotic genes SUPERWOMAN1, MADS3, MADS58, MADS13, and DROOPING LEAF in specifying floral organ identities and meristem fate. *Plant Cell* 23:2536–52
  14. Li H, Liang W, Jia R, Yin C, Zong J, et al. 2010. The AGL6-like gene OsMADS6 regulates floral organ and meristem identities in rice. *Cell Res* 20:299–313
  15. Li G, Kuijter HNJ, Yang X, Liu H, Shen C, et al. 2021. MADS1 maintains barley spike morphology at high ambient temperatures. *Nat Plants* 7:1093–10715
  16. Meng Q, Li X, Zhu W, Yang L, Liang W, et al. 2017. Regulatory network and genetic interactions established by OsMADS34 in rice inflorescence and spikelet morphogenesis. *J Integr Plant Biol* 59:693–707
  17. Gao X, Liang W, Yin C, Ji S, Wang H, et al. 2010. The SEPALLATA-like gene OsMADS34 is required for rice inflorescence and spikelet development. *Plant Physiol* 153:728–40
  18. Wu D, Liang W, Zhu W, Chen M, Ferrandiz C, et al. 2018. Loss of LOFSEP transcription factor function converts spikelet to leaf-like structures in rice. *Plant Physiol* 176:1646–64
  19. Zhu W, Yang L, Wu D, Meng Q, Deng X, et al. 2022. Rice SEPALLATA genes OsMADS5 and OsMADS34 cooperate to limit inflorescence branching by repressing the TERMINAL FLOWER1-like gene RCN4. *New Phytol* 233:1682–700
  20. Cai Q, Yuan Z, Chen M, Yin C, Luo Z, et al. 2014. Jasmonic acid regulates spikelet development in rice. *Nat Commun* 5:3476
  21. You X, Zhu S, Zhang W, Zhang J, Wang C, et al. 2019. OsPEX5 regulates rice spikelet development through modulating jasmonic acid biosynthesis. *New Phytol* 224:712–24
  22. Wang X, Chen Y, Liu S, Fu W, Zhuang Y, et al. 2023. Functional dissection of rice jasmonate receptors involved in development and defense. *New Phytol* 238:2144–58
  23. Hu Y, Liang W, Yin C, Yang X, Ping B, et al. 2015. Interactions of OsMADS1 with Floral Homeotic Genes in Rice Flower Development. *Mol Plant* 8:1366–84
  24. Yun D, Liang W, Dreni L, Yin C, Zhou Z, et al. 2013. OsMADS16 genetically interacts with OsMADS3 and OsMADS58 in specifying floral patterning in rice. *Mol Plant* 6:743–56
  25. Yoshida A, Suzaki T, Tanaka W, Hirano HY. 2009. The homeotic gene long sterile lemma (G1) specifies sterile lemma identity in the rice spikelet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20103–8
  26. Hong L, Qian Q, Zhu K, Tang D, Huang Z, et al. 2010. ELE restrains empty glumes from developing into lemmas. *J Genet Genomics* 37:101–15
  27. Zhang T, Li Y, Ma L, Sang X, Ling Y, et al. 2017. LATERAL FLORET 1 induced the three-florets spikelet in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:9984–89
  28. Zong J, Wang L, Zhu L, Bian L, Zhang B, et al. 2022. A rice single cell transcriptomic atlas defines the developmental trajectories of rice floret and inflorescence meristems. *New Phytol* 234:494–512
  29. Wang K, Tang D, Hong L, Xu W, Huang J, et al. 2010. DEP and AFO regulate reproductive habit in rice.

30. Jin Y, Luo Q, Tong H, Wang A, Cheng Z, et al. 2011. An AT-hook gene is required for palea formation and floral organ number control in rice. *Dev Biol* 359:277–88
31. Yuan Z, Gao S, Xue DW, Luo D, Li LT, et al. 2009. RETARDED PALEA1 controls palea development and floral zygomorphy in rice. *Plant Physiol* 149:235–44
32. Sang X, Li Y, Luo Z, Ren D, Fang L, et al. 2012. CHIMERIC FLORAL ORGANS1, encoding a monocot-specific MADS box protein, regulates floral organ identity in rice. *Plant Physiol* 160:788–807
33. Hu Y, Wang L, Jia R, Liang W, Zhang X, et al. 2021. Rice transcription factor MADS32 regulates floral patterning through interactions with multiple floral homeotic genes. *J Exp Bot* 72:2434–49
34. Tao J, Liang W, An G, Zhang D. 2018. OSMADS6 controls flower development by activating rice FACTOR OF DNA METHYLATION LIKE1. *Plant Physiol* 177:713–27
35. Ariizumi T, Toriyama K. 2012. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annual Review of Plant Biology* 62:437
36. Strand J, Knight C, Robson J, Talle B, Wilson ZA. 2021. Evolution and diversity of the angiosperm anther: trends in function and development. *Plant Reproduction* 00:1–13
37. Gomez JF, Talle B, Wilson ZA. 2015. Anther and pollen development: A conserved developmental pathway. *J Integr Plant Biology* 57:876–91
38. Shi JX, Cui MH, Yang L, Kim YJ, Zhang DB. 2015. Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. *Trends Plant Sci* 20:741–53
39. Zhang DB, Wilson ZA. 2009. Stamen specification and anther development in rice. *Chin Sci Bull* 54:2342–53
40. Wilson ZA, Zhang DB. 2009. From Arabidopsis to rice: pathways in pollen development. *J Exp Bot* 60:1479–92
41. Tan HX, Liang WQ, Hu JP, Zhang DB. 2012. MTR1 encodes a secretory fasciclin glycoprotein required for male reproductive development in rice. *Dev Cell* 22:1127–37
42. Yang L, Qian XL, Chen MJ, Fei QL, Meyers BC, et al. 2016. Regulatory role of a receptor-Like kinase in specifying anther cell identity. *Plant Physiol* 171:2085–100
43. Yang XJ, Li G, Tian YS, Song Y, Liang WQ, Zhang DB. 2018. A rice glutamyl-tRNA synthetase modulates early anther cell division and patterning. *Plant Physiol* 177:728–44
44. Fu ZZ, Yu J, Cheng XW, Zong X, Xu J, et al. 2014. The rice basic helix-loop-helix transcription factor TDR INTERACTING PROTEIN2 is a central switch in early anther development. *Plant Cell* 26:1512–24
45. Zhang DB, Yang L. 2014. Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther. *Cur Opin Plant Biol* 17:49–55
46. Li N, Zhang DS, Liu HS, Yin CS, Li XX, et al. 2006. The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell* 18:2999–3014
47. Zhang DS, Liang WQ, Yuan Z, Li N, Shi J, et al. 2008. Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development. *Mol Plant* 1:599–610
48. Niu NN, Liang WQ, Yang XJ, Jin WL, Wilson ZA, et al. 2013. EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. *Nature Commun* 4:11
49. Hu LF, Liang WQ, Yin CS, Cui XA, Zong J, et al. 2011. Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development. *Plant Cell* 23:515–33
50. Qu GR, Quan S, Mondol P, Xu J, Zhang DB, Shi JX. 2014. Comparative metabolomic analysis of wild type and mads3 mutant rice anthers. *J Integr Plant Biol* 56:849–63
51. Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, Yang CY, Liang WQ, et al. 2011. PERSISTENT TAPETAL CELL1

encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in Rice. *Plant Physiol* 156:615–30

52. Uzair M, Xu DW, Schreiber L, Shi JX, Liang WQ, et al. 2020. PERSISTENT TAPETAL CELL2 is required for normal tapetal programmed cell death and pollen wall patterning. *Plant Physiol* 182:962–76

53. Shi J, Tan HX, Yu XH, Liu YY, Liang WQ, et al. 2011. Defective Pollen Wall is required for anther and microspore development in rice and encodes a fatty acyl carrier protein reductase. *Plant Cell* 23:2225–46

54. Chen WW, Yu XH, Zhang KS, Shi JX, De Oliveira S, et al. 2011. Male Sterile2 encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 157:842–53

55. Mondol PC, Xu DW, Duan L, Shi JX, Wang CH, et al. 2020. Defective Pollen Wall 3 (DPW3), a novel alpha integrin-like protein, is required for pollen wall formation in rice. *New Phytol* 225:807–22

56. Men X, Shi JX, Liang WQ, Zhang QF, Lian GB, et al. 2017. Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 3 (OsGPAT3) is required for anther development and male fertility in rice. *J Exp Bot* 68:512–25

57. Li H, Pinot F, Sauveplane V, Werck-Reichhart D, Diehl P, et al. 2010. 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. *Plant Cell* 22:173–90

58. Yang XJ, Wu D, Shi JX, He Y, Pinot F, et al. 2014. Rice CYP703A3, a cytochrome P450 hydroxylase, is essential for development of anther cuticle and pollen exine. *J Integr Plant Biol* 56:979–94

59. Zhang DS, Liang WQ, Yin CS, Zong J, Gu FW, Zhang DB. 2010. OsC6, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development In Rice. *Plant Physiology* 154:149–62

60. Zhao GC, Shi JX, Liang WQ, Xue FY, Luo Q, et al. 2015. Two ATP Binding Cassette G Transporters, rice ATP Binding Cassette G26 and ATP Binding Cassette G15, collaboratively regulate rice male reproduction. *Plant Physiol* 169:2064–79

61. Zhu L, Shi JX, Zhao GC, Zhang DB, Liang WQ. 2013. Post-meiotic deficient anther1 (PDA1) encodes an ABC transporter required for the development of anther cuticle and pollen exine in rice. *J Plant Biol* 56:59–68

62. Xu DW, Shi JX, Rautengarten C, Yang L, Qian XL, et al. 2017. Defective Pollen Wall 2 (DPW2) encodes an acyl transferase required for rice pollen development. *Plant Physiol* 173:240–55

63. Zhang H, Liang WQ, Yang XJ, Luo X, Jiang N, et al. 2010. Carbon Starved Anther encodes a MYB domain protein that regulates sugar partitioning required for rice pollen development. *Plant Cell* 22:672–89

64. Zhu XL, Liang WQ, Cui X, Chen MJ, Yin CS, et al. 2015. Brassinosteroids promote development of rice pollen grains and seeds by triggering expression of Carbon Starved Anther, a MYB domain protein. *Plant J* 82:570–81

65. Liu ZH, Bao WJ, Liang WQ, Yin JY, Zhang DB. 2010. Identification of gamyb-4 and analysis of the regulatory role of GAMYB in rice anther development. *J Integr Plant Biol* 52:670–78

66. Xu J, Yang CY, Yuan Z, Zhang DS, Gondwe MY, et al. 2010. The ABORTED MICROSPORES regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22:91–107

67. Xu J, Ding ZW, Vizcay-Barrena G, Shi JX, Liang WQ, et al. 2014. ABORTED MICROSPORES acts as a master regulator of pollen wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 26:1544–56

68. Wang Y, Wang Y-F, Zhang D-B. 2006. Identification of the rice (*Oryza sativa* L.) mutant msp1-4 and expression analysis of its UDT1 and GAMYB genes. *Zhiwu Shengli yu Fenzi Shengwuxue Xuebao* 32:527–34

69. Yu JP, Han JJ, Kim YJ, Song M, Yang Z, et al. 2017. Two rice receptor-like kinases maintain male fertility under changing temperatures. *Proc Natl Acad Sci o USA* 114:12327–32

70. Wang DX, Li JB, Sun LL, Hu YY, Yu J, et al. 2021. Two rice MYB transcription factors maintain male fertility in response to photoperiod by modulating sugar partitioning. *New Phytol* 231:1612–29

71. Li JB, Wang DX, Sun SY, Sun LL, Zong J, et al. 2022. The regulatory role of CARBON STARVED ANTHHER-mediated photoperiod-dependent male fertility in rice. *Plant Physiol* 189:955–71
72. Sun SY, Wang DX, Li JB, Lei YQ, Li G, et al. 2021. Transcriptome analysis reveals photoperiod-associated genes expressed in rice anthers. *Front Plant Sci* 12:15
73. Zhang H, Xu CX, He Y, Zong J, Yang XJ, et al. 2013. Mutation in CSA creates a new photoperiod-sensitive genic male sterile line applicable for hybrid rice seed production. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:76–81
74. Li G, Liang WQ, Zhang XQ, Ren HY, Hu JP, et al. 2014. Rice actin-binding protein RMD is a key link in the auxin-actin regulatory loop that controls cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:10377–82
75. Zhang Z, Zhang Y, Tan H, Wang Y, Li G, et al. 2011. RICE MORPHOLOGY DETERMINANT encodes the type II formin FH5 and regulates rice morphogenesis. *Plant Cell* 23:681–700
76. Li G, Yang X, Zhang X, Song Y, Liang W, Zhang D. 2018. Rice Morphology Determinant-mediated actin filament organization contributes to pollen tube growth. *Plant Physiol* 177:255–70
77. Huang G, Liang W, Sturrock CJ, Pandey BK, Giri J, et al. 2018. Rice actin binding protein RMD controls crown root angle in response to external phosphate. *Nat Commun* 9:2346
78. Song Y, Li G, Nowak J, Zhang X, Xu D, et al. 2019. The rice actin-binding protein RMD regulates light-dependent shoot gravitropism. *Plant Physiol* 181:630–44
79. Liu J, Guo J, Zhang H, Li N, Litao Yang, et al. 2009. Development and in-house validation of the event-specific polymerase chain reaction detection methods for genetically modified soybean MON89788 based on the cloned integration flanking sequence. *J Agric Food Chem* 57:10524–30
80. Yang L, Guo J, Zhang H, Liu J, Zhang D. 2008. Qualitative and quantitative event-specific PCR detection methods for oxy-235 canola based on the 3' integration flanking sequence. *J Agric Food Chem* 56:1804–09
81. Yang L, Pan A, Zhang H, Guo J, Yin C, et al. 2006. Event-specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis for genetically modified canola T45. *J Agric Food Chem* 54:9735–40
82. Pan AH, Litao Yang, Xu SC, Yin CS, Zhang KW, et al. 2006. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based upon the 3'-transgene integration sequence. *J Cereal Sci* 43:250–57
83. Yang L, Pan A, Zhang KW, Yin CS, Qian BJ, et al. 2005. Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton Mon1445 and Mon531. *Transgenic Res* 14:817–31
84. Yang L, Shen HF, Pan AH, Chen JX, Huang C, et al. 2005. Screening and construct specific detection methods of transgenic Huafan No. 1 tomato by conventional and real-time PCR. *J Sci Food Agric* 85:2159–66
85. Yang L, Xu SC, Pan AH, Yin CS, Zhang KW, et al. 2005. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified MON863 maize based on the 5'-transgene integration sequence. *J Agric Food Chem* 53:9312–18
86. Weng HB, Aihu Pan, Litao Yang, Chengmei Zhang, Zhili Liu, et al. 2004. Estimating transgene copy number by real-time PCR assay using HMG I/Y as an endogenous reference gene in transgenic rapeseed. *Plant Mol Biol Rep* 22:289–300
87. Yang L, Ding JY, Zhang CM, Jia JW, Weng HB, et al. 2005. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. *Plant Cell Rep* 23:759–763
88. Yang L, Wang C, Holst-Jensen A, Morisset D, Lin Y, et al. 2013. Characterization of GM events by insert knowledge adapted re-sequencing approaches. *Sci Rep* 3:2839
89. Ding JY, Jia JW, Litao Yang, Weng HB, Zhang CM, et al. 2004. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. *J Agric Food Chem* 52:3372–77
90. Weng HB, Litao Yang, Liu ZL, Ding JY, Pan AH, et al. 2005. Novel reference gene, High-mobility-group

protein I/Y, used in qualitative and real-time quantitative polymerase chain reaction detection of transgenic rapeseed cultivars. *JAOAC Int* 88:577–84

91. Yang L, Pan AH, Jia JW, Ding JY, Chen JX, et al. 2005. Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. *J Agric Food Chem* 53:183–90

92. Yang L, Chen JX, Huang C, Liu YH, Jia SR, et al. 2005. Validation of a cotton-specific gene, Sad1, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic cottons. *Plant Cell Rep* 24:237–45

93. Guo J, Litao Yang, Liu X, Zhang H, Qian B, et al. 2009. Applicability of the chymopapain gene used as endogenous reference gene for transgenic huanong no. 1 papaya detection. *J Agric Food Chem* 57:6502–09

94. Huang H, Cheng F, Wang R, Zhang D, Yang LT. 2013. Evaluation of four endogenous reference genes and their real-time PCR assays for common wheat quantification in GMOs detection. *PLoS One* 8:e75850

95. Yang L, Pan AH, Zhang KW, Guo JC, Yin CS, et al. 2005. Identification and quantification of three genetically modified insect resistant cotton lines using conventional and TaqMan real-time polymerase chain reaction methods. *J Agric Food Chem* 53:6222–29

96. Guo J, Litao Yang, Liu X, Guan X, Jiang L, et al. 2009. Characterization of the exogenous insert and development of event-specific PCR detection methods for genetically modified Huanong No. 1 papaya. *J Agric Food Chem* 57:7205–12

97. Liu D, Shen J, Litao Yang, Zhang D. 2010. Evaluation of the impacts of different nuclear DNA content in the hull, endosperm, and embryo of rice seeds on GM rice quantification. *J Agric Food Chem* 58:4582–87

98. Wang C, Jiang L, Rao J, Liu Y, Litao Yang, et al. 2010. Evaluation of four genes in rice for their suitability as endogenous reference standards in quantitative PCR. *J Agric Food Chem* 58:11543–47

99. Jiang LX, Litao Yang, Rao J, Guo JC, Wang S, et al. 2010. Development and in-house validation of the event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON15985. *J Sci Food Agric* 90:402–8

100. Wu Y, Litao Yang, Cao Y, Song G, Shen P, et al. 2013. Collaborative validation of an event-specific quantitative real-time PCR method for genetically modified rice event TT51-1 detection. *J Agric Food Chem* 61:5953–60

101. Yang L, Zhang H, Guo J, Pan L, Zhang D. 2008. International collaborative study of the endogenous reference gene LAT52 used for qualitative and quantitative analyses of genetically modified tomato. *J Agric Food Chem* 56:3438–43

102. Jiang L, Litao Yang, Zhang H, Guo J, Mazzara M, et al. 2009. International collaborative study of the endogenous reference gene, sucrose phosphate synthase (SPS), used for qualitative and quantitative analysis of genetically modified rice. *J Agric Food Chem* 57:3525–32

103. Shen K, Li X, Wang S, Pan Y, Shi Z, et al. 2010. Establishment and in-house validation of simplex and duplex PCR methods for event-specific detection of maize SYN-E3272-5 using a new reference molecule. *JAOAC Int* 93:663–75

104. Wang S, Xiang Li, Litao Yang, Kailin Shen, Dabing Zhang. 2009. Development and in-house validation of a reference molecule pMIR604 for simplex and duplex event-specific identification and quantification of GM maize MIR604. *Eur Food Res Technol* 230:239–48

105. Li X, Litao Yang, Zhang J, Wang S, Shen K, et al. 2009. Simplex and duplex polymerase chain reaction analysis of Herculex RW (59122) maize based on one reference molecule including separated fragments of 5' integration site and endogenous gene. *JAOAC Int* 92:1472–83

106. Zhang H, Yang L, Guo J, Li X, Jiang L, et al. 2008. Development of one novel multiple-target plasmid

for duplex quantitative PCR analysis of roundup ready soybean. *J Agric Food Chem* 56:5514–20

107. Yang L, Guo J, Pan A, Zhang H, Zhang K, et al. 2007. Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maize using one novel standard reference molecule. *J Agric Food Chem* 55:15–24

108. Zhang Y, Zhang D, Li W, Chen J, Peng Y, et al. 2003. A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Res* 31:e123

109. Yang L, Liang W, Jiang L, Li W, Cao W, et al. 2008. A novel universal real-time PCR system using the attached universal duplex probes for quantitative analysis of nucleic acids. *BMC Mol Cell Biol* 9:54

110. Guo J, Yang L, Chen L, Morisset D, Li X, et al. 2011. MPIC: a high-throughput analytical method for multiple DNA targets. *Anal Chem* 83:1579–86

111. Guan X, Guo J, Shen P, Yang L, Zhang D. 2010. Visual and rapid detection of two genetically modified soybean events using loop-mediated isothermal amplification method. *Food Anal Methods* 3:313–20

112. Dong W, Yang L, Shen K, Kim B, Kleter GA, et al. 2008. GMDD: a database of GMO detection methods. *BMC Bioinformatics* 9:260

113. Hu C, Shi J, Quan S, Cui B, Kleessen S, Nikoloski Z, Tohge T, et al. 2014. Metabolic variation between japonica and indica rice cultivars as revealed by non-targeted metabolomics. *Sci Rep* 4:5067

114. Lin H, Rao J, Shi J, Hu C, Cheng F, Wilson ZA, Zhang D, Quan S. 2014. Seed metabolomic study reveals significant metabolite variations and correlations among different soybean cultivars. *J Integr Plant Biol* 56:826–36

115. Rao J, Cheng F, Hu C, Quan S, Lin H, Wang J, Chen G, et al. 2014. Metabolic map of mature maize kernels. *Metabolomics* 10:775–787

116. Rao J, Yang L, Guo J, Quan S, Chen G, Zhao X, Zhang D, Shi J. 2016. Metabolic changes in transgenic maize mature seeds over-expressing the *Aspergillus niger* phyA2. *Plant Cell Rep* 35:429–37