

## ‘无子瓯柑’ E3 泛素连接酶基因 *CsRNF217* 对转基因烟草育性的影响

叶潇铃<sup>1,2</sup>, 赵宇虹<sup>1,2</sup>, 姜楠<sup>1,2</sup>, 张敏<sup>3</sup>, 张迟<sup>1,2</sup>

(1. 浙江农林大学 园艺科学学院 农业农村部亚热带果品蔬菜质量安全控制重点实验室, 浙江 杭州 311300;

2. 浙江农林大学 园艺科学学院 浙江省山区农业高效绿色生产协同创新中心, 浙江 杭州 311300; 3. 浙江农林大学 林业与生物技术学院 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 【目的】为了验证‘无子瓯柑’ *Citrus suavissima* ‘Seedless’ E3 泛素连接酶基因 *CsRNF217* 对雄蕊育性的影响, 采用异源转化获得过表达 *CsRNF217* 的转基因烟草 *Nicotiana tabacum*, 分析其对烟草育性的影响。【方法】采用亚历山大染色法、花粉离体培养法、杂交授粉后的结实率分析野生型烟草及转基因烟草自交 1 代 ( $T_1$ ) 阳性株系的花粉活力及胚囊育性, 利用半定量 RT-PCR 分析基因 *CsRNF217* 在转基因烟草  $T_1$  阳性株系花药中的表达强弱。【结果】‘无子瓯柑’ *CsRNF217* 在转基因烟草自交  $T_1$  株系中高效表达, 转基因株系的花粉染色活力和离体萌发率、自交结实率、以及与野生型的正反交结实率均显著低于野生型 ( $P < 0.05$ )。【结论】过表达 *CsRNF217* 的烟草植株花粉育性显著下降, 同时伴随胚囊育性下降的现象, 推测 *CsRNF217* 基因对‘无子瓯柑’雌雄育性存在负向调控的作用。图 5 表 3 参 22

**关键词:** 柑橘; E3 泛素连接酶; 雄性不育; 胚囊败育

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)06-1181-07

## Fertility effect of E3 ubiquitin ligase gene *CsRNF217* in transgenic tobacco plants

YE Xiaoling<sup>1,2</sup>, ZHAO Yuhong<sup>1,2</sup>, JIANG Nan<sup>1,2</sup>, ZHANG Min<sup>3</sup>, ZHANG Chi<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruit and Vegetable, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Horticulture Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;

2. Collaborative Innovation Center for Efficient and Green Production of Agriculture in Mountainous Areas of Zhejiang Province, College of Horticulture Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. State Key

Laboratory of Subtropical Silviculture, College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] This study, with an investigation into the transgenic plants of tobacco (*Nicotiana tabacum*) overexpressing *CsRNF217*, is aimed to verify the effect of the E3 ubiquitin ligase gene *CsRNF217* of *Citrus suavissima* ‘Seedless’ on male sterility. [Method] First, an analysis was conducted of the pollen viability of wild type (WT) and the positive plants of the 1st generation of selfing of transgenic plants ( $T_1$ ) with the employment Alexander staining and pollen germination in vitro. Then, the seed setting rate was obtained via selfing and reciprocal crosses between transgenic plants and WT. Finally, semi-quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was used to analyze the relative expression of *CsRNF217*

收稿日期: 2022-11-21; 修回日期: 2023-05-04

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGN18C160005, LGN22C150006); 浙江省育种专项 (2021C02066-1)

作者简介: 叶潇铃 (ORCID: 0000-0001-7548-7878), 从事柑橘分子生物学研究。E-mail: 2020601042053@stu.zafu.edu.cn。通信作者: 张迟 (ORCID: 0000-0003-3760-7917), 副教授, 博士, 从事柑橘分子生物学研究。E-mail: zhangchi1978@zafu.edu.cn

in  $T_1$  positive tobacco plants. [Result] *CsRNF217* derived from *C. suavis* ‘Seedless’ was efficiently expressed in  $T_1$  lines. The pollen dyeing viability and in vitro germination rate of  $T_1$  lines, selfing seed setting rate of  $T_1$  lines, and seed setting rate of  $T_1$  lines reciprocal crosses with WT were significantly lower than those of WT ( $P < 0.05$ ). [Conclusion]  $T_1$  plants overexpressing *CsRNF217* had a severe decline in pollen fertility and partial aberrant of embryo sac, suggesting that an up-regulation of *CsRNF217* could play a negative regulatory role on male and female fertility of *C. suavis* ‘Seedless’. [Ch, 5 fig. 3 tab. 22 ref.]

**Key words:** *Citrus*; E3 ubiquitin ligase; male sterility; embryo sac abortion

瓯柑 *Citrus suavis* 优良新品种 ‘无子瓯柑’ *C. suavis* ‘Seedless’ 是通过芽变选种获得的, 其果实无核, 遗传性状稳定<sup>[1]</sup>。与瓯柑相比, 两者的花粉量相当, 但 ‘无子瓯柑’ 花药不易开裂, 自然散发的花粉少<sup>[2]</sup>。形态学和细胞学研究表明: 小孢子母细胞减数分裂异常是 ‘无子瓯柑’ 雄性不育的重要原因之一<sup>[2-3]</sup>。瓯柑及 ‘无子瓯柑’ 花粉发育早期的花药转录组与蛋白质组关联分析结果表明: 差异代谢通路主要富集在苯丙素生物合成、黄酮类化合物生物合成和苯丙氨酸代谢通路<sup>[4]</sup>。*CsRNF217* 基因是瓯柑与 ‘无子瓯柑’ 在小孢子母细胞时期与苯丙素生物合成途径密切相关的重要基因, 与瓯柑相比, 该基因在同时期的 ‘无子瓯柑’ 中显著上调表达; *CsRNF217* 基因的氨基酸序列中存在 RING-HC\_RBR 和 IBR 2 个结构域, 属于典型的单亚基 RING-HC E3 亚家族, 定位于细胞核<sup>[5]</sup>。

泛素化是真核生物中一种高度通用的翻译后修饰, 它介导蛋白酶体降解、细胞运输、蛋白质相互作用和细胞蛋白质的功能激活<sup>[6-8]</sup>。泛素化级联需要 3 种不同的酶催化: E1 泛素激活酶、E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶<sup>[9]</sup>。其中, E3 泛素连接酶具有显著的多样性, 它决定了底物的特异性, 并作为调节细胞反应的枢纽<sup>[10-11]</sup>。E3 泛素连接酶分为单亚基和多亚基两类。单亚基组由 3 个主要的亚家族组成: RING、HECT 以及 U-box 结构域家族<sup>[11-13]</sup>。*CsRNF217* 基因即属于单亚基 RING 结构域家族。E3 泛素连接酶在植物的生长发育过程中起着关键的作用, 包括细胞程序性死亡和抗病防御反应<sup>[14]</sup>、成花调控<sup>[15]</sup>、生物<sup>[16]</sup>和非生物应激反应<sup>[14]</sup>以及花粉发育<sup>[17-19]</sup>等。其中, 在水稻 *Oryza sativa*<sup>[17]</sup>、拟南芥 *Arabidopsis thaliana*<sup>[18]</sup>、白菜 *Brassica campestris* ssp. *chinensis*<sup>[19]</sup> 中发现的 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *DSNP1*、*DAF*、*Bra015092* 等在花粉发育过程中起重要作用。

本研究以过表达 ‘无子瓯柑’ *CsRNF217* 的转基因烟草 *Nicotiana tabacum* 植株为材料, 通过对基因表达分析、转基因自交 1 代植株 ( $T_1$ ) 花粉活力、转基因植株自交及与野生型烟草正反交的结实率等参数的测定, 分析过表达 *CsRNF217* 对转基因烟草植株育性的影响, 为进一步揭示 *CsRNF217* 基因在 ‘无子瓯柑’ 雌雄败育过程中的重要作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以野生型烟草 (WT) 作为对照, 采用农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法获得过表达 *CaMV 35S::CsRNF217* 的阳性转基因烟草<sup>[5]</sup> ( $T_0$ )。将  $T_0$  自交种子穴盘播种获得转基因烟草自交 1 代植株 ( $T_1$ )。采集  $T_1$  阳性烟草植株 6#、35#、63# 株系的叶片及含苞待放花蕾的花药, 立即置于液氮中速冻并于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存, 用于半定量 RT-PCR 分析。

### 1.2 DNA 提取及阳性植株鉴定

采集野生型烟草及  $T_1$  烟草植株的叶片, 采用 CTAB 法提取 DNA, 以 pCAMBIA 2300s : *CsRNF217* 质粒作为阳性对照, ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照, 用 35S\_F 及基因特异引物 *CsRNF217\_R838\_S*<sup>[5]</sup> (表 1) 进行 PCR 检测筛选阳性植株, PCR 程序为  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min;  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s,  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min, 35 次循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min;  $12\text{ }^\circ\text{C}$  保存。

### 1.3 花粉活力检测及半定量 RT-PCR 分析

于晴天 10:00 采集烟草含苞待放的花蕾, 采用亚历山大染色法<sup>[20]</sup>对野生型烟草及经 PCR 鉴定的  $T_1$  阳性植株进行花粉染色活力检测, 采用花粉离体培养法<sup>[21]</sup>对花粉染色活力显著下降的烟草单株进行

花粉萌发试验, 每个植株随机挑选 3 朵花作为生物学重复。花粉粒被染为紫红色的视为有活力的花粉粒, 花粉管长度大于或等于花粉粒直径视为萌发。花粉染色活力=着色花粉粒数/视野中的花粉粒总数 $\times 100\%$ , 花粉萌发率=萌发花粉粒数/视野中的花粉粒总数 $\times 100\%$ 。

使用 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa, 日本) 试剂盒, 提取野生型烟草及花粉活力显著下降的  $T_1$  烟草阳性植株花药 RNA, 采用 EASYScript

one-step gDNA removal and cDNA synthesis supermix (TransGen Biotech code#AE311- 03) 试剂盒进行 cDNA 合成, 使用 *CsRNF217* 基因对引物和烟草内参基因 *EF1 $\alpha$*  特异引物 (表 1) 进行半定量 RT-PCR 分析, 程序为 94  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 29 次循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min; 12  $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 1.4 野生型烟草及转基因 $T_1$ 烟草植株杂交授粉

于晴天 10:00 收集野生型和  $T_1$  已开花, 但未散粉植株的花药于离心管, 4  $^{\circ}\text{C}$  干燥保存备用。于傍晚用干净的小镊子摘去即将开放花蕾的花瓣和雄蕊。次日 10:00 蘸取花粉轻点已分泌黏液的柱头, 套袋, 每个植株进行 3 朵花的正反交重复, 3 d 后摘去袋子。正反交组合配置中, 正交授粉以转基因株系为父本, 野生型为母本; 反交授粉以野生型为父本, 转基因株系为母本。种子成熟时统计每个单株采收的蒴果数, 测量蒴果横径、纵径及种子总质量。

#### 1.5 数据处理与统计分析

采用 SPSS 软件对种子萌发率、花粉染色活力、花粉离体萌发率、蒴果横纵径及种子数量等进行了单因素方差分析 (one-way ANOVA, LSD)。

## 2 结果与分析

### 2.1 $T_1$ 烟草植株阳性检测

$T_0$  烟草种子穴盘播种共获得 137 个单株, 其中 6#株系 16 株, 35#株系 80 株, 63#株系 41 株。以野生型及  $T_0$  种子播种获得的烟草叶片 DNA 为模板, 经 PCR 检测, 共获得 68 株阳性植株 (表 2)。其中, 6#株系 10 株, 35#株系 33 株, 63#株系 25 株, 阳性率分别为 62.5%、41.2%、61.5%。

### 2.2 花粉活力及半定量 RT-PCR 检测结果

$T_1$  阳性烟草植株花粉的散粉量与野生型存在差异 (图 1)。野生型植株花药开裂后, 散粉量多, 可见大量花粉散布于花瓣及柱头;  $T_1$  阳性烟草植株花药裂开后, 散粉量少, 几乎无可见花粉散出。经染色法和花粉离体萌发培养 (图 2):  $T_1$  阳性烟草植株花粉染色活力显著低于野生型植株 (图 3,  $P < 0.05$ )。

有活力的花粉粒经亚历山大染色后呈紫红色, 无活力的花粉粒呈黄褐色。野生型植株经亚历山大染色后花粉粒大多呈紫红色 (94.5%), 阳性植株呈紫红色的花粉粒数量显著少于野生型 (图 3,  $P < 0.05$ )。其中 6#株系的 14 号单株 (6#14)、35#株系的 4 号单株 (35#4)、63#株系的 4 号单株 (63#4) 的花粉经亚历山大染色后着色率最低, 分别为 9.6%、12.0%、9.7%。有活力的花粉粒能在适宜的离体条件下萌发,  $T_1$  阳性植株花粉粒的萌发率显著低于野生型植株 (60.3%)。其中 6#株系的 9 号单株 (6#9)、6#株系的 14 号单株 (6#14)、63#株系的 4 号单株 (63#4) 的花粉粒萌发率在各株系中最低, 分别为 30.6%、29.0%、33.4%。半定量 RT-PCR 分析显示 (图 4): *CsRNF217* 基因在过表达的各株系中均能表达, 其中, 外源基因在 63#株

表 1 引物信息

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>CsRNF217</i> _R838_S	GTCGACTTGCATAGAGCCAATAAA
35S_F	ACGCACAATCCCACTATCCTTC
<i>CsRNF217</i> _qL2	ACGTGCGAGGGTATGAAAGA
<i>CsRNF217</i> _qR2	TACCCTCCATGCCACTTCAG
<i>EF1<math>\alpha</math></i> -F	TGGTTGTGACTTTTGGTCCCA
<i>EF1<math>\alpha</math></i> -R	ACAAACCCACGCTTGAGATCC

表 2 野生型及  $T_1$  烟草植株阳性率与花粉染色活力

株系	株数/株	阳性株数/株	植株阳性率/%	花粉染色活力均值/%
6#	16	10	62.5	19.5 $\pm$ 2.7 b
35#	80	33	41.2	31.9 $\pm$ 2.8 b
63#	41	25	61.5	21.8 $\pm$ 2.3 b
WT	3	0	0	94.5 $\pm$ 2.4 a

说明: 同列不同字母表示不同株系间花粉染色活力差异显著 ( $P < 0.05$ )。WT 为野生型株系。

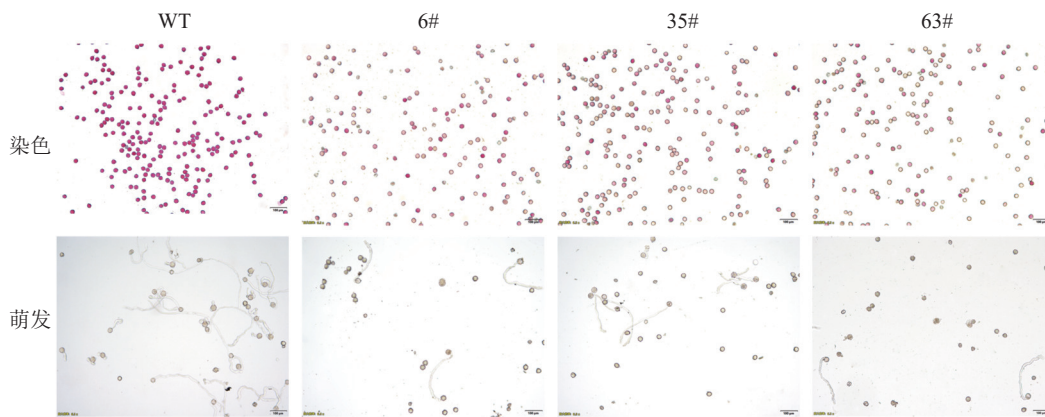




WT表示野生型烟草；6#9、6#10、6#14分别表示T<sub>1</sub>植株6#株系的第9、10、14号单株；35#1、35#4、35#31分别表示T<sub>1</sub>植株35#株系的第1、4、31号单株；63#4、63#13、63#41分别表示T<sub>1</sub>植株63#株系的第4、13、41号单株。

图1 野生型与T<sub>1</sub>阳性植株成熟花药形态及散粉情况

Figure 1 Anther morphology and pollen release of wild type and T<sub>1</sub> positive plants



WT表示野生型烟草。

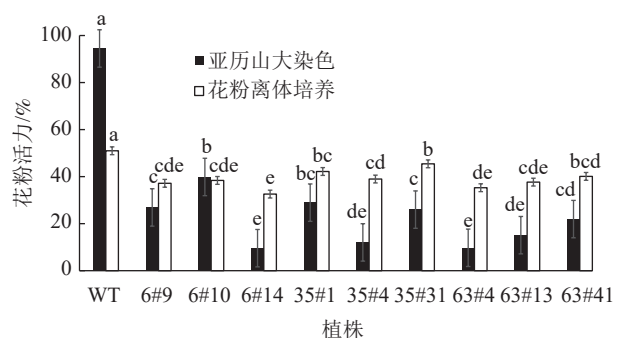
图2 野生型及T<sub>1</sub>阳性植株的花粉活力

Figure 2 Pollen viability of wild type and T<sub>1</sub> positive plants

系各单株花药中的表达量最高。

### 2.3 野生型烟草及转基因T<sub>1</sub>植株杂交授粉结果

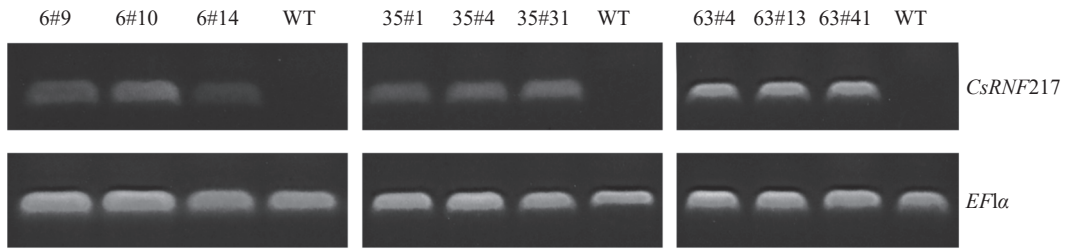
对花粉染色活力、萌发率都显著低于野生型的T<sub>1</sub>转基因阳性单株进行授粉(表3, 图5)表明: 自交和与野生型进行正反交的各授粉组合均能结实, 但蒴果大小及种子数量存在较大差异。蒴果横径的比较结果显示: 转基因63#株系自交、与野生型进行正反交的蒴果横径均显著小于野生型自交的蒴果( $P < 0.05$ ); 35#株系自交蒴果的横径显著小于野生型自交( $P < 0.05$ )。蒴果纵径的比较结果显示: 转基因63#株系自交和与野生型反交的蒴果纵径均显著小于野生型自交( $P < 0.05$ ), 其余组合与野生型自交无显著差异。根据烟草原始种的种子千粒重(0.087 g)<sup>[22]</sup>, 计算每个株系的单果种子数量。阳性株系自交、与野生型正反交获得的种子数量都显著低于野生型自交种子数( $P < 0.05$ ), 但转基因株系之间无显著差异。



WT表示野生型烟草；6#9、6#10、6#14分别表示T<sub>1</sub>植株6#株系的第9、10、14号单株；35#1、35#4、35#31分别表示T<sub>1</sub>植株35#株系的第1、4、31号单株；63#4、63#13、63#41分别表示T<sub>1</sub>植株63#株系的第4、13、41号单株。不同字母表示各单株间差异显著( $P < 0.05$ )。

图3 野生型及T<sub>1</sub>阳性植株的花粉活力

Figure 3 Pollen vitality of wild-type and T<sub>1</sub> positive plants



WT 表示野生型烟草；6#9、6#10、6#14 分别表示  $T_1$  植株 6# 株系的第 9、10、14 号单株；35#1、35#4、35#31 分别表示  $T_1$  植株 35# 株系的第 1、4、31 号单株；63#4、63#13、63#41 分别表示  $T_1$  植株 63# 株系的第 4、13、41 号单株。

图 4 野生型及  $T_1$  阳性植株半定量 RT-PCR 分析

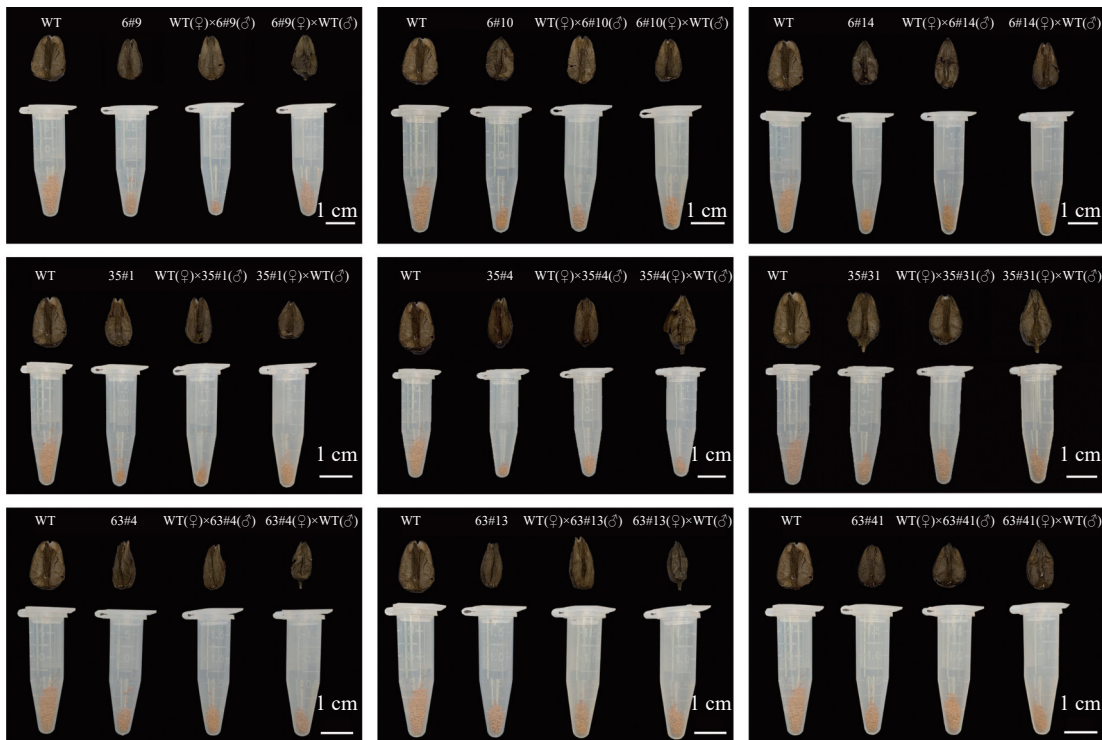
Figure 4 Semi-quantitative RT-PCR of wild type and  $T_1$  positive plants

表 3 野生型及阳性株系自交及杂交试验的蒴果大小和种子数量

Table 3 Capsule and seed number in selfing and hybridization test

处理	株系	蒴果横径/mm	蒴果纵径/mm	种子数量/(粒·果 <sup>-1</sup> )
自交	WT	9.2±0.2 a	15.8±0.2 a	1 525.7±19.9 a
	6#	8.9±0.1 ab	14.9±0.1 ab	1 030.4±105.2 b
	35#	8.4±0.1 bcd	14.9±0.1 ab	948.5±37.3 b
	63#	8.4±0.0 bcd	14.6±0.1 b	1 006.7±36.0 b
正交	WT (♀) × 6# (♂)	8.5±0.1 abcd	15.2±0.4 ab	845.5±69.4 b
	WT (♀) × 35# (♂)	8.6±0.2 abc	14.3±0.2 b	924.6±26.7 b
	WT (♀) × 63# (♂)	8.1±0.2 cd	15.0±0.4 ab	1 049.8±8.0 b
反交	6# (♀) × WT (♂)	8.6±0.2 abc	15.1±0.5 ab	1 103.4±119.8 b
	35# (♀) × WT (♂)	9.1±0.3 ab	14.8±0.5 ab	992.3±185.9 b
	63# (♀) × WT (♂)	7.8±0.3 d	14.4±0.4 b	914.4±90.7 b

说明：WT表示野生型烟草。同列不同字母表示株系间差异显著( $P < 0.05$ )。



WT 表示野生型烟草；6#9、6#10、6#14 分别表示  $T_1$  植株 6# 株系的第 9、10、14 号单株；35#1、35#4、35#31 分别表示  $T_1$  植株 35# 株系的第 1、4、31 号单株；63#4、63#13、63#41 分别表示  $T_1$  植株 63# 株系的第 4、13、41 号单株。

图 5 野生型与  $T_1$  阳性植株自交及与野生型正反交授粉后的蒴果及种子

Figure 5 Capsules and seeds of wild type and  $T_1$  positive plants after self-crossing and cross-pollination with wild type

### 3 讨论

研究表明：过表达 *CsRNF217* 的烟草植株在花粉染色活力、花粉萌发率、蒴果大小及种子数量上均显著低于野生型，说明过表达 *CsRNF217* 降低了转基因烟草的小孢子育性，甚至对胚囊育性也存在一定的影响。

近年来的研究表明：RING 型 E3 泛素连接酶基因参与了植物花粉发育<sup>[19]</sup>、花药开裂<sup>[18]</sup>、胚囊发育<sup>[17]</sup>等生命过程。水稻中的 RING 型 E3 泛素连接酶 *DSNP1* 与水稻减数分裂过程中的联会复合体组装和同源重组关系密切，其突变体 *dsn1* 中形成的稳定同源配对和重组交叉严重减少，并最终形成活性较低的花粉<sup>[17]</sup>。然而，白菜中过表达 E3 泛素连接酶基因 *Bra015092*，也降低了转基因白菜的花粉染色活力和萌发率，并导致了花粉外部形态的畸形<sup>[19]</sup>。前期研究表明：‘无子瓯柑’成熟花粉的染色活力和离体萌发率均显著低于有籽瓯柑，其小孢子母细胞减数分裂异常<sup>[2-3]</sup>，*CsRNF217* 的表达在小孢子发育早期显著上调<sup>[5]</sup>。本研究中过表达 *CsRNF217* 的烟草花粉离体萌发率为野生型的一半，花粉染色活力则更低。推测 *CsRNF217* 基因可能通过负调控小孢子母细胞的减数分裂过程参与‘无子瓯柑’的花粉发育。拟南芥 E3 泛素连接酶基因 *DAF* 在雄蕊中特异表达，并通过正向调控茉莉酸生物合成途径来促进花药开裂，通过干涉实验抑制其表达的植株则表现为雄性不育<sup>[18]</sup>。‘无子瓯柑’的花药自然开裂难、散粉量低<sup>[2-3]</sup>，实时定量 PCR 结果显示：*CsRNF217* 基因在雄蕊的表达丰度显著高于其他花器官<sup>[5]</sup>。本研究中，过表达 *CsRNF217* 的转基因烟草也表现出自然散粉较弱的特性，推测 *CsRNF217* 可能参与了花药开裂的调控。

以野生型花粉对水稻不育突变体 *dsn1* 进行授粉，突变体不能结实，表明该突变体既是雄性不育的，也表现出雌性不育<sup>[17]</sup>，说明该 RING 型 E3 泛素连接酶 *DSNP1* 对水稻的雌雄育性都有影响。本研究表明：转基因烟草不仅花粉活力显著下降，其种子数量也显著减少，说明 *CsRNF217* 的超量表达在负调控花粉育性的同时，对胚囊的育性也存在一定的调控作用。在生产实践中，‘无子瓯柑’在同其他有籽柑橘品种混栽时也表现无籽，说明胚囊败育是‘无子瓯柑’果实无核的重要原因，因此 *CsRNF217* 对‘无子瓯柑’胚囊育性的影响值得进一步研究。

### 4 结论

E3 泛素连接酶基因 *CsRNF217* 对转基因烟草的育性存在显著影响，过表达‘无子瓯柑’*CsRNF217* 的 T<sub>1</sub> 烟草阳性植株雌雄育性均显著下降，推测 *CsRNF217* 对‘无子瓯柑’的育性存在负调控作用。

### 5 参考文献

- [1] 徐象华, 颜福花, 叶荣华, 等. 瓯柑研究进展[J]. 浙江林业科技, 2008, 28(3): 75 - 77.  
XU Xianghua, YAN Fuhua, YE Ronghua, et al. Advances in researches of *Citrus reticulata* cv. *suavissima* [J]. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 2008, 28(3): 75 - 77.
- [2] 曾燕如, 张炼炳, 斯金平, 等. 无籽瓯柑无核原因的研究[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22(4): 359 - 362.  
ZENG Yanru, ZHANG Lianbing, SI Jinping, et al. Preliminary study on seedlessness of seedless Ougan [J]. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 2005, 22(4): 359 - 362.
- [3] 张迟, 张敏, 朱铨, 等. ‘瓯柑’及其无籽突变体花粉发育的细胞学观察[J]. 果树学报, 2014, 31(2): 265 - 269.  
ZHANG Chi, ZHANG Min, ZHU Quan, et al. Cytological observation of pollen development in ‘Ougan’ (*Citrus suavissima* Hort. ex Tanaka) and its seedless mutant [J]. *Journal of Fruit Science*, 2014, 31(2): 265 - 269.
- [4] ZHANG Chi, YU Dihui, KE Fuzhi, et al. Seedless mutant ‘Wuzi Ougan’ (*Citrus suavissima* Hort. ex Tanaka ‘seedless’) and the wild type were compared by iTRAQ-based quantitative proteomics and integratedly analyzed with transcriptome to improve understanding of male sterility [J/OL]. *BMC Genetics*, 2018, 19(1): 106 [2022-11-10]. doi: 10.1186/s12863-018-0693-9.
- [5] 孙明艳, 叶潇铃, 蔡子涵, 等. 无籽瓯柑E3泛素连接酶基因*CsRNF217*的克隆与功能分析[J]. 果树学报, 2022, 39(2): 845 - 855.  
SUN Mingyan, YE Xiaoling, CAI Zihan, et al. Cloning and functional analysis of E3 ubiquitin ligase gene *CsRNF217* in



- Wuzi Ougan (*Citrus suavisissima*) [J]. *Journal of Fruit Science*, 2022, **39**(2): 845 – 855.
- [6] FOOT N, HENSHALL T, KUMAR S. Ubiquitination and the regulation of membrane proteins [J]. *Physiological Reviews*, 2017, **97**(1): 253 – 281.
- [7] SASAKI A T, CARRACEDO A, LOCASALE J W, *et al.* Ubiquitination of K-Ras enhances activation and facilitates binding to select downstream effectors [J/OL]. *Science Signaling*, 2011, **4**(163): ra13[2022-11-10]. doi: 10.1126/scisignal.2001518.
- [8] SHARMA B, JOSHI D, YADAV P K, *et al.* Role of ubiquitin-mediated degradation system in plant biology [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, **7**: 806[2022-11-10]. doi: 10.3389/fpls.2016.00806.
- [9] GUERRA D D, CALLIS J. Ubiquitin on the move: the ubiquitin modification system plays diverse roles in the regulation of endoplasmic reticulum- and plasma membrane-localized proteins [J]. *Plant Physiology*, 2012, **160**(1): 56 – 64.
- [10] BUETOW L, HUANG D T. Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, **17**(10): 626 – 642.
- [11] SHU Kai, YANG Wenyu. E3 ubiquitin ligases: ubiquitous actors in plant development and abiotic stress responses [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2017, **58**(9): 1461 – 1476.
- [12] DESHAIES R J, JOAZEIRO C A. RING domain E3 ubiquitin ligases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, **78**: 399 – 434.
- [13] MARÍN I. Evolution of plant HECT ubiquitin ligases [J/OL]. *PLoS One*, 2013, **8**(7): e68536[2022-11-10]. doi: 10.1371/journal.pone.0068536.
- [14] SHIRSEKAR G S, VEGA-SANCHEZ M E, BORDEOS A, *et al.* Identification and characterization of suppressor mutants of *sp11*-mediated cell death in rice [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2014, **27**(6): 528 – 536.
- [15] LU Dongping, LIN Weiwei, GAO Xiquan, *et al.* Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity [J]. *Science*, 2011, **332**(6036): 1439 – 1442.
- [16] LUO Hongli, LALUK K, LAI Zhibin, *et al.* The arabidopsis botrytis susceptible1 interactor defines a subclass of RING E3 ligases that regulate pathogen and stress responses [J]. *Plant Physiology*, 2010, **154**(4): 1766 – 1782.
- [17] REN Lijun, ZHAO Tingting, ZHAO Yangzi, *et al.* The E3 ubiquitin ligase DESYNAPSIS1 regulates synapsis and recombination in rice meiosis [J/OL]. *Cell Reports*, 2021, **37**(5): 109941[2022-11-10]. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109941.
- [18] PENG Yanjhu, SHIH Chingfang, YANG Junyi, *et al.* A RING-type E3 ligase controls anther dehiscence by activating the jasmonate biosynthetic pathway gene DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2013, **74**(2): 310 – 327.
- [19] TIAN Aimei, YU Hui, CUI Zhuoyue. Functional characterization of E3 ubiquity ligase *Bra015092* in pollen development of *Brassica campestris* ssp. *Chinensis* [J/OL]. *Physiologia Plantarum*, 2022, **174**(6): e13808[2022-11-10]. doi: 10.1111/pp1.13808.
- [20] PETERSON R, SLOVIN J P, CHEN Changbin. A simplified method for differential staining of aborted and nonaborted pollen grains [J/OL]. *International Journal of Plant Biology*, 2010, **1**(2): e13[2022-11-10]. doi: 10.4081/pb.2010.e13.
- [21] 牛永志, 陈志芸, 索文龙, 等. 不同培养基组分对烟草花粉管生长的影响[J]. 云南农业大学学报, 2020, **35**(1): 82 – 87.  
NIU Yongzhi, CHEN Zhiyun, SUO Wenlong, *et al.* The influence of medium composition on the growth of tobacco pollen tube [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2020, **35**(1): 82 – 87.
- [22] 李佛琳, 马宇雷, 张国锋. 烟草种子含钾量和千粒重的基因型差异[J]. 种子, 2000(6): 18 – 21.  
LI Folin, MA Yulei, ZHANG Guofeng. Genotypic differences in potassium contents and weight of tobacco seeds [J]. *Seed*, 2000(6): 18 – 21.