作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2023, 49(11): 2913–2922 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.33002

一个玉米 *ZmMs7* 复等位基因突变体的遗传分析与分子鉴定

曹枭雄[1,2] 刘伊凡[1,2] 周玉强[2] 王 婧[2] 吴宇锦[2] 王红武[2] 李 坤[2] 刘小刚[2] 黄长玲[2] 刘志芳[2] 郭晋杰[1,*] 胡小娇[2,*]

[1] 河北农业大学农学院 / 国家玉米改良中心河北分中心 / 华北作物改良与调控国家重点实验室, 河北保定 071001; [2] 中国农业科学院作物科学研究所 / 作物分子育种国家工程研究中心, 北京 100081

摘 要: 我们在自然群体中发现了一个玉米雄性不育突变体(*male sterile mutant*), 命名为 *ms20s1*。该突变体雄花育性彻底丧失, 花药干瘪皱缩, 没有花粉形成。细胞学分析发现, 与野生型相比, *ms20s1* 突变体花药在 S11 期表现出明显的药室收缩, 绒毡层细胞肿胀, 小孢子破裂的表型, 表明 *ms20s1* 突变体绒毡层细胞程序性死亡出现异常, 且花粉败育。遗传分析表明该不育性状受单个隐性核基因控制。为克隆目标基因, 以 *ms20s1* 为母本分别与不同自交系杂交构建 F_2 定位群体, 利用靶向测序技术(GBTS)分析群体基因型, 将基因定位于 7 号染色体 124.95~128.47 Mb 之间, 进一步精细定位将该区间缩小到 0.68 Mb。生物信息学分析发现, 该区间存在一个已知基因 *ZmMs7*。*ZmMs7* 基因编码 PHD-finger 转录因子, 在绒毡层发育和花粉外壁的形成过程中发挥重要作用。等位测验分析发现 *ms20s1* 为 *ZmMs7* 基因的等位突变体。基因测序结果表明 *ms20s1* 突变体在外显子区存在多处序列变异, 与所报道的 *ZmMs7* 基因已知突变体 *ms7-6007* 和 *ms7gl* 的突变方式不同, 证明 *ms20s1* 是一个新的 *ZmMs7* 基因等位突变体。突变体 *ms20s1* 的发现与鉴定为探讨玉米核雄性不育的分子机制以及育种应用提供了新的材料。

关键词: 玉米; 雄性不育; *ms20s1*; 基因定位; 等位突变

Genetic analysis and molecular identification of a multiple allele mutant of *ZmMs7* gene in maize

CAO Xiao-Xiong[1,2], LIU Yi-Fan[1,2], ZHOU Yu-Qiang[2], WANG Jing[2], WU Yu-Jin[2], WANG Hong-Wu[2], LI Kun[2], LIU Xiao-Gang[2], HUANG Chang-Ling[2], LIU Zhi-Fang[2], GUO Jin-Jie[1,*], and HU Xiao-Jiao[2,*]

[1] College of Agronomy, Hebei Sub-center of National Maize Improvement Center of China / State Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation / Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China; [2] Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Engineering Research Center of Crop Molecular Breeding, Beijing 100081, China

Abstract: We identified a maize male sterile mutant in the natural population, designated as *ms20s1*. The mutant had complete male sterility and lacked pollen grains in the withered anthers. Cytological analysis showed that, compared with the wild type, the *ms20s1* mutant exhibited shrinkage locule, swollen tapetum cells, and aborted microspore at S11 stage, indicating that the *ms20s1* mutant had abnormal tapetal programmed cell death and complete pollen abortion. Genetic analysis revealed that the male sterility trait was controlled by a single recessive nuclear gene. To clone the target gene, we constructed the F_2 populations by crossing *ms20s1* with different inbred lines and analyzed the population genotype using genotyping by target sequencing (GBTS) technology. The gene was initially mapped to the 124.95–128.47 Mb region on chromosome 7, and the interval was narrowed down to 0.68 Mb after fine mapping. Bioinformatics analysis indicated that there was one known gene *ZmMs7* in this region. The *ZmMs7*

本研究由国家重点研发计划项目(2022YFD1200802), 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ZDRW202004), 作物分子育种国家工程研究中心和河北省玉米现代种业科技创新团队项目(21326319D)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1200802), the Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ZDRW202004), the National Engineering Research Center of Crop Molecular Breeding, and the Science and Technology Innovation Team of Maize Modern Seed Industry in Hebei (21326319D).

* 通信作者(Corresponding authors): 胡小娇, E-mail: huxiaojiao@caas.cn; 郭晋杰, E-mail: guojinjie512@163.com

第一作者联系方式: E-mail: caoxx13@163.com

Received (收稿日期): 2023-01-05; Accepted (接受日期): 2023-04-17; Published online (网络出版日期): 2023-05-05.

URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20230504.1553.002.html

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

gene encoded a PHD-finger transcription factor that played an important role in tapetum development and pollen wall formation. Allelism test demonstrated that *ms20s1* was an allelic mutant of *ZmMs7* gene. Gene sequencing results showed that the *ms20s1* mutant had multiple sequence variants in the exon region, which were different from the reported mutants *ms7-6007* and *ms7gl*, confirming *ms20s1* was a new allelic mutant of *ZmMs7*. The discovery and identification of the *ms20s1* mutant provide a new material for exploring the molecular mechanism and breeding application of maize genic male sterility.

Keywords: maize; *male sterility*; *ms20s1*; gene mapping; allelic mutant

玉米是全球第一大粮食作物, 也是杂种优势利用最成功的作物。杂交种在生长势、生活力、抗逆性、产量和品质上显著优于 2 个亲本, 因此广泛应用于玉米生产[1]。目前, 玉米杂交制种主要利用人工或机械去除母本雄穗不但费时费力成本高, 且不利于植物生长, 从而降低杂交种的产量[2]。利用玉米雄性不育系生产玉米杂交种可以有效解决以上问题。雄性不育可分为细胞质雄性不育(CMS)和细胞核雄性不育(GMS)[3], CMS 又称为核质互作雄性不育, 以 CMS 为基础的三系制种已成功应用于多种作物的杂交制种, 但是 CMS 材料存在表型不稳定、易受病原小种专化感染、恢复系少等缺点[3-4], 限制了 CMS 材料的应用。GMS 育性由核基因控制, 可以克服 CMS 的缺陷, 具有巨大的育种应用潜力。虽然 GMS 不育系存在保持和繁种困难的问题, 但是随着现代生物技术的快速发展, 转基因和基因编辑技术的广泛应用, 有望将隐性核不育基因有效利用起来[5]。

在拟南芥和水稻中, 已有大量研究解析了调控花药和花粉发育的过程[6-7], 同时也揭示了 14 个花药的发育阶段。与水稻花药发育过程相比, 玉米花药发育的变化与其高度一致, 同样也可划分为 14 个时期。花药的发育从雄蕊原基开始, 经过一系列分裂分化, 花药从最外层到最内层形成表皮层、内皮层、中间层和绒毡层 4 个典型层。绒毡层是 4 层壁细胞中代谢最为活跃的一层, 在植物体小孢子发育过程中有非常关键的作用[8]。在小孢子发育的前期, 绒毡层细胞会给花粉母细胞提供大分子物质及营养供给以促进其发育[9-10]; 在小孢子发育中期会分泌花粉外壁前体, 如孢粉素是构成花粉壁和花药表皮角质层的重要物质[11]; 在小孢子发育后期绒毡层会分泌花粉外壳或含油层[12-14]。而绒毡层细胞程序性死亡(PCD)也会为小孢子的发育提供蛋白质、脂类等营养物质, 对于花粉的形成、成熟以及育性都有影响[15-17]。在已报道的众多植物雄性不育突变体中, 绒毡层发育缺陷型雄性不育是最多的一类[18]。且在不同植物中, 也有多个与绒毡层发育相关的基因被克隆, 如在拟南芥中发现 *EMS1* 基因编码一个富含亮氨酸重复序列的受体蛋白激酶(LRR-RPK), 其表达与小孢子母细胞和绒毡层细胞的分化有关, 突变后导致败育[19]; 在水稻中发现 bHLH 家族转录因子 *TIP2* 启动其同源基因 *TDR* 和 *EAT1* 的表达。*TIP2* 与 *TDR* 相互作用来调控绒毡层分化, 促进绒毡层 PCD, 然后 *TDR* 与 *EAT1* 相互作用调节绒毡层细胞死亡, *TIP2* 突变导致水稻雄性不育[20]; 在玉米中发现 *MS32* 基因编码一个 bHLH 蛋白, *ms32* 由于绒毡层前体细胞不能分化, 导致花粉母细胞发育失败, 最终影响其育性[21]等。

本研究对一个新玉米雄性不育突变体 *ms20s1* 进行了表型鉴定、细胞学观察、遗传分析和基因定位, 最终发现 *ms20s1* 是已知基因 *ZmMs7* 的新等位突变体。研究结果为深入解析玉米雄性不育的分子机制奠定了基础, 为细胞核雄性不育的育种应用提供了新材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米雄性不育突变体 *ms20s1* 是自交系也铁 21 背景的自然突变体。由于雄性不育突变体不能够自交繁殖, 因此我们通过对杂合体植株进行连续自交和表型鉴定来分离和保存 *ms20s1* 突变体。本研究中用于表型鉴定和细胞学分析的材料为杂合植株连续自交 5 代后分离出的野生型(WT)和突变体。基因定位群体为突变体 *ms20s1* 与自交系 B73、Mo17、昌 7-2 (C7-2)杂交并自交获得的 F_2 分离群体。用于等位测验的突变体 *ms7-6007* 为北京科技大学化学与生物工程学院万向元教授馈赠。

1.2 突变体的表型鉴定与细胞学观察

在玉米抽雄散粉期开展表型鉴定, 对 WT 和 *ms20s1* 的雄穗、花药和花粉进行比较, 同时调查株高、穗位高、雄穗分枝数、叶长和叶宽等重要农艺性状。细胞学观察以 WT 及 *ms20s1* 在 S8a、S8b、S9、S10 及 S11 五个时期[2]的花药为试验材料, 用 FAA 固定液保存, 固定后的组织材料进行脱水、透明、浸蜡与包埋, 将包埋好的蜡块切片黏附于载玻片上并干燥, 然后染色并用树脂封片, 自然晾干。再

用 OLYMPLUS BX53 正置显微镜(奥林巴斯, 日本)观察并照相。

1.3　突变体的遗传分析和基因定位

对于突变体表型的遗传分析, 在玉米散粉期统计不同遗传背景的 F_2 群体中可育单株与不育单株的分离比, 并利用卡方测验确定遗传模式。在 *ms20s1* 与 B73 构建的 F_2 定位群体中随机选取 69 株不育单株, 利用 CTAB 法提取群体及双亲的基因组 DNA。利用 10K GBTS 靶向测序技术分析样品基因型[22]。基因初定位采用 SNP-index 算法, 通过计算每个多态性 SNP 标记的 SNP-index, 即突变体基因型占所有 F_2 样本基因型的频率, SNP-index 越接近 1, 表明标记与目标基因连锁越紧密[23]。为精细定位目标基因, 我们扩大 F_2 定位群体数量, 并开发 5 对插入缺失标记(insertion-deletion, InDel), InD124、InD125、InD127、InD128、InD130 (表 1), 进一步缩小定位区间。

1.4　基因组 DNA 提取、PCR 扩增和序列分析

用 CTAB 法提取亲本及突变体 *ms20s1* 的基因组 DNA。利用 Primer 5 软件设计引物(表 1), 扩增 *ZmMs7* 基因组序列。以 WT 与 *ms20s1* 基因组 DNA 为模板, 分别扩增 *ZmMs7* 基因片段, 将 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。使用 DNAMAN 软件比对分析测序结果, 确定基因突变情况。试验采用南京诺唯赞生物科技有限公司的 PCR 反应试剂, 扩增体系为 2× PCR Mix 10 mL, 正向和反向引物(10 μmol L^{-1}) 0.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 补超纯水至 20 μL。PCR 扩增条件为 94℃预变性 3 min; 94℃变性 15 s, 58℃退火 15 s, 72℃延伸 2 min, 34 个循环; 72℃延伸 5 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

1.5　RNA 提取及基因组织表达分析

基因的组织表达分析以自交系 C7-2 苗期的叶和根, 拔节期的叶、根和第 3 节茎间, 抽雄期的叶、根、雄穗、叶耳、雌穗、第 3 节茎间、花丝及花药为研究材料。用植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司, Cat# DP432)提取不同组织的 RNA。利用反转录试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司, Cat# KR118-02)反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 设计特异引物 20q-F/R, 并以 Tubulin (*Zm00001d013367*)为内参基因(表 1), 在 Bio-Rad CFX96 实时定量 PCR 仪上进行荧光定量分析。按 $2^{-\Delta CT}$ 方法[24]计算 *ZmMs7* 基因在各个组织中的表达水平, 分析其组织表达模式。

表 1　本研究采用的 **PCR** 引物
Table 1　PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer (5′–3′)	反向引物 Reverse primer (5′–3′)	用途 Usage
InD124	GCACTGAAGGCTTATTTCGTCG	TTTTTGGTCGTTGCTGCTGAT	基因定位
InD125	AGCAGGAACGAAAAGGCACT	GCAAAACAGGACACGCATCA	Gene mapping
InD127	CCCTGCTATGACGACTTTTTTTCT	ACTCTTGGTTGTCCACCGTGC	
InD128	CCCGCTCATTGCTCTGTTG	CCAAGCGAGCAGGCACAT	
InD130	GCTCTTGATTTGCGAGGTGGT	GCTGTGAGTGTGATGCGTGTG	
20q	CTTGGACACCAAGCACTTCGTC	CAGGGTGACCGTCTCGTACG	基因表达分析
Tubulin	GTGTCCTGTCCACCCACTCTCT	GGAACTCGTTCACATCAACGTTC	Gene expression
Ms7-P1	CAGAACAGAGCAGAGGAACCAT	GGATAACCAAACGAAACACGAGCC	基因克隆
Ms7-P2	GGAGAAACCGTCCAAAGGC	AAACCTTCGTGGTAATCTTTGAC	Gene cloning
Ms7-P3	GTCTTGGACACCAAGCACTTCGT	TGCCATGGCGGCTATAGGAGTT	基因克隆/CAPS 鉴定 Gene cloning/CAPS

2　结果与分析

2.1　突变体 ***ms20s1*** 的表型鉴定和细胞学观察

在玉米抽雄散粉期, 野生型和突变体植株都能够正常抽雄。野生型雄花花药饱满且颜色较黄, 能够正常开裂及散粉, 自交可正常结实; 而 *ms20s1* 不育株花药干瘪较小且颜色较淡, 颖壳不开裂, 花药不外露(图 1-C, D)。*ms20s1* 作母本与其他野生型植株杂交后可正常结实。对野生型和突变体的花药进行 I_2-KI 染色, 发现野生型花粉粒呈黑褐色, 而 *ms20s1* 花药中没有花粉粒, 表明突变体为无花粉型雄性不育(图 1-E, F)。进一步对比野生型与突变体植株, 发现 *ms20s1* 在株高、雄穗主轴长度和雄穗分枝数上有显著差异外(表 2), 其他农艺性状和野生型植

株无明显差异(图 1-A, B)。

为了确定 *ms20s1* 花药发育异常产生的时期, 我们对玉米不同发育时期的花药进行了石蜡切片和细胞学观察。花药横切面观察表明, 在 S8a~S8b 时期, WT 和 *ms20s1* 花药中小孢子母细胞开始减数分裂, 依次产生二分体和四分体, 绒毡层细胞质浓缩, 着色加深, 表型没有明显差异; S9 时产生的小孢子被释放出来, WT 和 *ms20s1* 花药发育开始出现差异; S10 时小孢子开始液泡化, WT 相较于 *ms20s1* 来说更为饱满, *ms20s1* 液泡收缩更早。S11 时 WT 花药小孢子囊泡开始逐步消失, 绒毡层细胞开始退化, 而 *ms20s1* 药室开始收缩, 绒毡层细胞降解异常, 小孢子破裂退化(图 2)。

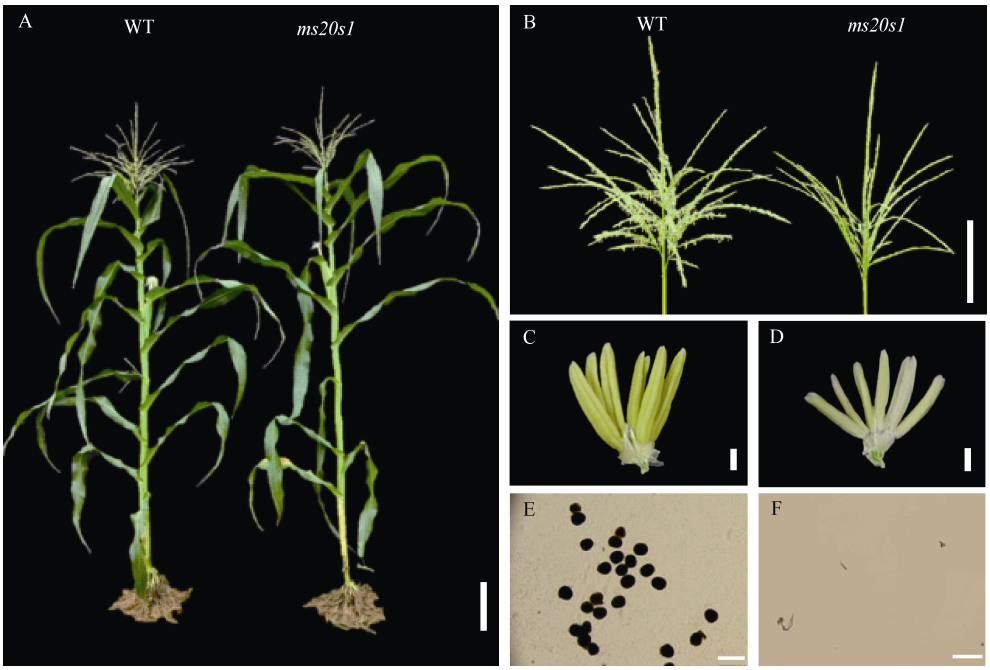


图 1 野生型和突变体 *ms20s1* 的表型比较

Fig. 1 Comparison of phenotypes between wild type and *ms20s1* mutant

A: 散粉期野生型(WT)与突变体 *ms20s1* 植株的形态比较, 标尺为 20 cm; B: 散粉期野生型(WT)与突变体 *ms20s1* 的雄穗比较, 标尺为 20 cm; C、D: 野生型(C)与突变体 *ms20s1* 植株(D)的花药比较, 标尺为 1 mm; E、F: 野生型(E)与突变体 *ms20s1* (F)被 I_2-KI 染色后的花粉粒, 标尺为 200 μm。

A: the comparison of plant morphology between wild type and *ms20s1* mutant at anthesis stage, bar: 20 cm; B: the comparison on tassel traits between the WT and *ms20s1* mutant at anthesis stage, bar: 20 cm; C, D: the comparison of the anther morphology between the WT (C) and *ms20s1* mutant (D), bar: 1 mm; E, F: pollen grains of WT (E) and *ms20s1* mutant (F) stained with I_2-KI, bar: 200 μm.

表 2 野生型和突变体重要农艺性状比较

Table 2 Comparison of important agronomic traits between WT and *ms20s1*

农艺性状 Agronomic trait	野生型 WT	突变体 *ms20s1*
株高 Plant height (cm)	188.13±3.88	178.83±3.53*
穗位高 Ear height (cm)	77.20±6.04	76.50±4.89
雄穗主轴长 Total tassel length (cm)	41.01±2.29	38.48±2.21*
雄穗分枝数 Tassel branch number	16.00±1.73	19.00±2.00*
穗上 1 叶长 Leaf length-1 (cm)	88.33±3.94	90.65±3.27
穗上 2 叶长 Leaf length-2 (cm)	82.26±3.03	84.32±4.25
穗上 3 叶长 Leaf length-3 (cm)	75.17±3.20	74.75±3.80
穗上 1 叶宽 Leaf width-1 (cm)	8.03±0.41	7.70±0.43
穗上 2 叶宽 Leaf width-2 (cm)	7.61±0.43	7.43±0.35
穗上 3 叶宽 Leaf width-3 (cm)	7.22±0.41	6.93±0.47
穗上 1 叶夹角 Leaf angle-1 (°)	30.74±1.54	30.18±1.37
穗上 2 叶夹角 Leaf angle-2 (°)	31.19±1.47	31.27±1.52
穗上 3 叶夹角 Leaf angle-3 (°)	32.13±2.63	32.98±3.43

表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。 means significant difference at $P < 0.05$.

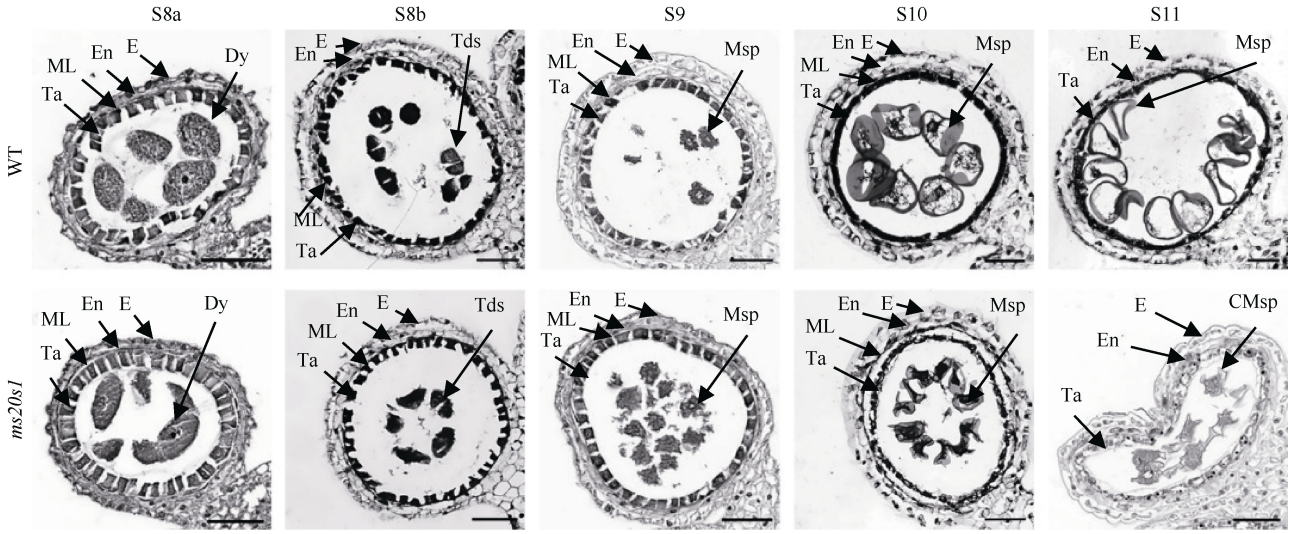


图 2　WT 和 *ms20s1* 突变体玉米花药(S8a~S11 期)的横切面分析

Fig. 2　Transverse section analyses of anther (from stage 8a to stage 11) in WT and *ms20s1* mutant

E: 表皮层; En: 内皮层; ML: 中间层; Ta: 绒毡层; Msp: 小孢子; CMsp: 收缩的小孢子; Dy: 二分体; Tds: 四分体。标尺为 50 μm。

E: epidermis; En: endothecium; ML: middle layer; Ta: tapetum; Msp: microspore; CMsp: collapsed microspore; Dy: dyad; Tds: tetrads. Bar: 50 μm.

2.2　*ms20s1* 的遗传分析与基因定位

将该突变体分别与 B73、Mo17、C7-2 进行杂交，F_1 均表现为野生型。统计 F_1 自交得到的 3 个 F_2 群体中野生型和突变体的数目，经卡方检验其分离比都符合 3∶1 (表 3)，表明 *ms20s1* 雄性不育性状是受单个隐性核基因控制。为克隆该基因，以 B73 为遗传背景的 F_2 分离群体为材料，利用 CTAB 法提取 69 株不育植株的叶片及其亲本 DNA，利用 10K GBTS 靶向测序技术分析样本基因型。去除杂合及双亲之间的无多态性位点，数据分析表明亲本间存在多态性的 SNP 标记数量为 4745 个，占总位点数的 47.45%，平均每条染色体上的数目为 474 个，其中 1 号染色体最多为 850 个，6 号染色体最少为 361 个 (图 3)。分析所有多态性 SNP 位点对应的 SNP-index

表 3　F_2 群体表型分离的卡方检测

Table 3　Chi-square test for phenotypic segregation in F_2 population

群体 Population	总株数 Total number of plants	可育植株 Number of fertile plants	不育植株 Number of male sterile plants	期望比 Expected rate	χ^2
F_2 (*ms20s1*×B73)	379	285	94	3:1	0.0009
F_2 (*ms20s1*×Mo17)	181	139	42	3:1	0.2228
F_2 (*ms20s1*×C7-2)	990	769	221	3:1	3.6418

$\chi^2_{(0.05)\,(1)} = 3.84$.

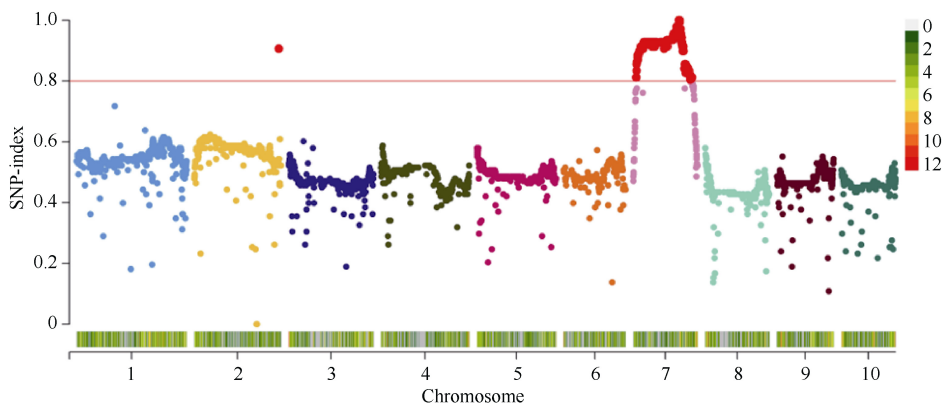


图 3　SNP-index 全基因组频率分布图

Fig. 3　Distribution of SNP-index on whole genome

在全基因组水平上的变化，发现在 7 号染色体上 124.95~128.47 Mb 区间可能与目标性状连锁(图 3)，增加 F_2 群体个数到 192，同时开发 5 个 InDel 标记(InD124、InD125、InD127、InD128、InD130)，最终将基因定位在 7 号染色体的 InD127 和 InD128 标记之间，左侧标记处交换单株数为 4，右侧标记处交换单株数为 3，物理距离为 0.68 Mb (图 4-A)。利用 MaizeGDB (https://www.maizegdb.org/)网站检索候选区段的基因及其功能注释，发现该区间内共有 13 个蛋白编码基因，其中包含一个已经报道的玉米雄性不育基因 *ZmMs7* (*Zm00001d020680*)。

2.3 *ms20s1* 与 *ms7-6007* 的等位测验

为了验证 *ms20s1* 是否为 *ZmMs7* 基因的等位突变，我们利用 *ZmMs7* 基因的已知突变体 *ms7-6007* 杂合基因型单株做父本与 *ms20s1* 不育单株杂交，同时再以 *ms20s1* 杂合基因型单株作父本与 *ms7-6007* 不育单株作杂交，在这 2 个杂交后代群体中均出现了雄性不育植株(图 5-A)，观察其花药及被 I_2-KI 染色后的花粉，证实其不育表型(图 5-B，C)。分别统计 2 种杂交方式后代不育单株和可育单株数量。以 *ms20s1* 为母本的等位测验中，共调查了 196 株，表现为野生型表型的有 96 株，表现为突变体表型的有 100 株。以 *ms7-6007* 为母本的等位测验中，共调查了 296 株，表现为野生型表型的有 151 株，突变体表型的有 145 株。经卡方检验分析表明野生型与突变体植株的分离比均符合 1∶1，证明 *ms20s1* 是 *ms7-6007* 新的等位突变体(表 4)。

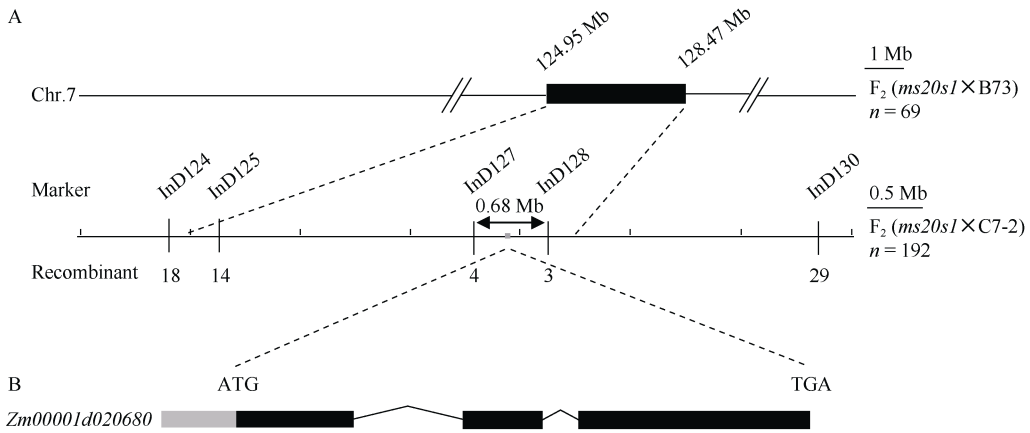
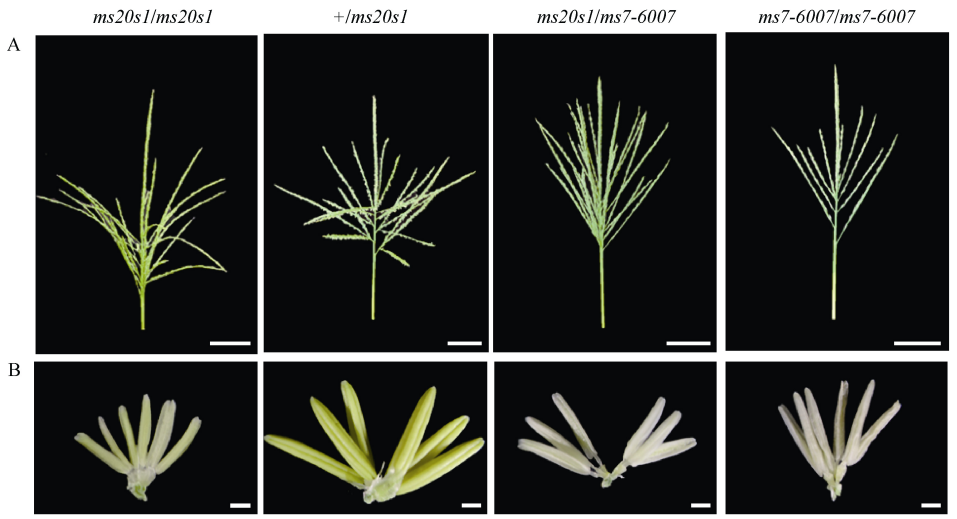


图 4 *ms20s1* 的精细定位和 *ZmMs7* 基因的结构示意图

Fig. 4 Fine mapping of *ms20s1* mutant and structure schematic diagram of *ZmMs7* gene

A: *ms20s1* 的精细定位。Marker: 标记名称; N: 群体大小; Recombinant: 重组单株数; B: *ZmMs7* 基因的结构示意图。灰色框代表 5′非翻译区; 黑色框代表外显子区，横线代表内含子区。

A: fine mapping of *ms20s1* mutant. Marker: marker names; N: F_2 recessive population used in mapping; recombinant: the number of recombinants; B: the structure schematic diagram of *ZmMs7* gene. The grey box represents the 5′ un-translated region. The black boxes represent the exons and the horizontal lines represent introns.



(图 5)

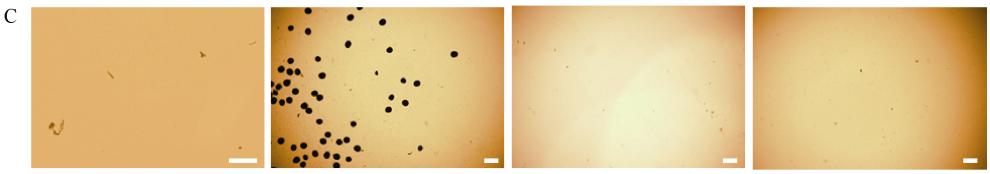


图 5　*ms7-6007* 的杂合体与 *ms20s1* 突变体等位测验

Fig. 5　Allelism test of *ms7-6007* heterozygotes and *ms20s1* mutants

A: 从左到右分别为 *ms20s1* 突变体、杂交后代中的可育植株、杂交后代中的不育植株、*ms7-6007* 突变体的雄穗, 标尺为 10 cm; B: 从左到右分别为 *ms20s1* 突变体、杂交后代中的可育植株、杂交后代中的不育植株、*ms7-6007* 突变体的花药, 标尺为 1 mm; C: 从左到右分别为 *ms20s1* 突变体、杂交后代中的可育植株、杂交后代中的不育植株、*ms7-6007* 突变体被 I_2-KI 染色后的花粉粒, 标尺为 100 μm。

A: plants from left to right are the tassels of the *ms20s1* mutant, the fertile hybrid plant, the sterile hybrid plant, and the *ms7-6007* mutant, respectively, bar: 10 cm; B: plants from left to right are the anthers of the *ms20s1* mutant, the fertile hybrid plant, the sterile hybrid plant, and the *ms7-6007* mutant, respectively, bar: 1 mm; C: plants from left to right are the I_2-KI staining of pollen grains of the *ms20s1* mutant, the fertile hybrid plant, the sterile hybrid plant, and the *ms7-6007* mutant, respectively, bar: 100 μm.

表 4　*ms20s1* 与 *ms7-6007* 突变体等位测验

Table 4　Allelism test of *ms20s1* with *ms7-6007*

父母本基因型 Parental genotype	表型统计 Phenotypic statistics		总株数 Number of the total plants	$\chi^2(1:1)$
	可育植株 Fertile plants	不育植株 Sterile plants		
ms20s1×+/*ms7-6007*	96	100	196	0.0459
ms7-6007×+/*ms20s1*	151	145	296	0.0844

$\chi^2_{(0.05)(1)} = 3.84$.

2.4　*ms20s1* 突变位点的鉴定

为进一步验证确认 *ms20s1* 的突变位点, 以 B73 中的 *ZmMs7* 基因组序列为参考, 共设计 3 对 PCR 引物(表 1), 分别扩增野生型和 *ms20s1* 突变体中 *ZmMs7* 基因序列, 扩增产物覆盖了 *ZmMs7* 基因全长。对扩增产物测序发现, *ms20s1* 突变体中 *ZmMs7* 基因在第 1 个外显子 ATG 下游 22 bp 处缺失了 3 个碱基; 第 3 个外显子上的第 999 个碱基由 T 突变为 C, 缬氨酸变为丙氨酸; 第 1176 个碱基由 A 突变为 G, 组氨酸变为精氨酸; 第 1193 个碱基由 G 突变为 C, 丙氨酸变为脯氨酸(图 4-B)。与已报道的突变体 *ms7-6007* 第 2 外显子有 7 个碱基插入及突变体 *ms7gl* 第 3 个外显子有转座子插入的突变方式不同, 以上研究结果充分证实 *ms20s1* 是 *ZmMs7* 基因的新等位突变体。

我们根据 A 到 G 的 SNP 变异, 开发了一个 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)酶切标记。使用引物 Ms7-P3 (表 1)扩增需要鉴定植株的基因组序列(图 6-A), *ms20s1* 突变体在突变位点附近包含一个 *Sna*B I 限制性内切酶的酶切位点, 野生型由于未发生由 A 到 G 的变异, 不能被 *Sna*B I 酶切(图 6-B)。该标记可以作为 *ms20s1* 基因型鉴定的功能性共分离分子标记使用, 为后续不育性状向优异母本种质的回交转育和制种应用奠定基础。

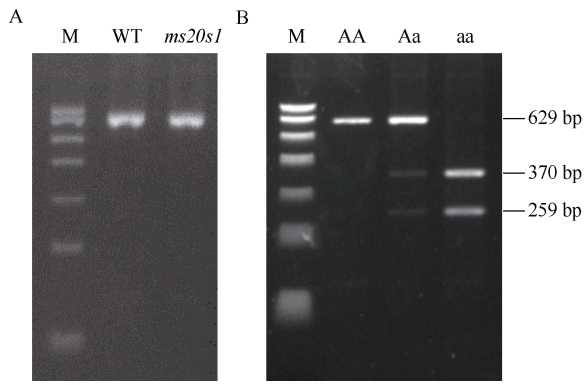


图 6　基因型鉴定

Fig. 6　Genotype identification

A: CAPS 标记 PCR 产物; B: *Sna*B I 酶切产物, AA、Aa、aa 分别代表纯合野生型、杂合野生型、纯合突变体。

A: PCR products of the CAPS markers; B: *Sna*B I digestion product. AA, Aa, and aa represent homozygous wild type, heterozygous wild type, and homozygous mutant, respectively.

2.5　*ZmMs7* 基因的组织特异性分析

突变体 *ms20s1* 主要表现在花药形态及其功能上的改变, 所以我们预测该基因在花药中特异表达。分别提取野生型在苗期, 拔节期和抽雄期不同组织的 RNA 并反转录, 利用实时荧光定量 PCR 检测 *ZmMs7* 基因的表达量(表 1)。结果显示, *ZmMs7* 基因在根、茎、叶等营养器官中的表达量非常微弱, 在花药中特异表达(图 7-A)。进一步分析该基因在不同发育阶段花药中的表达水平发现, *ZmMs7* 基因在

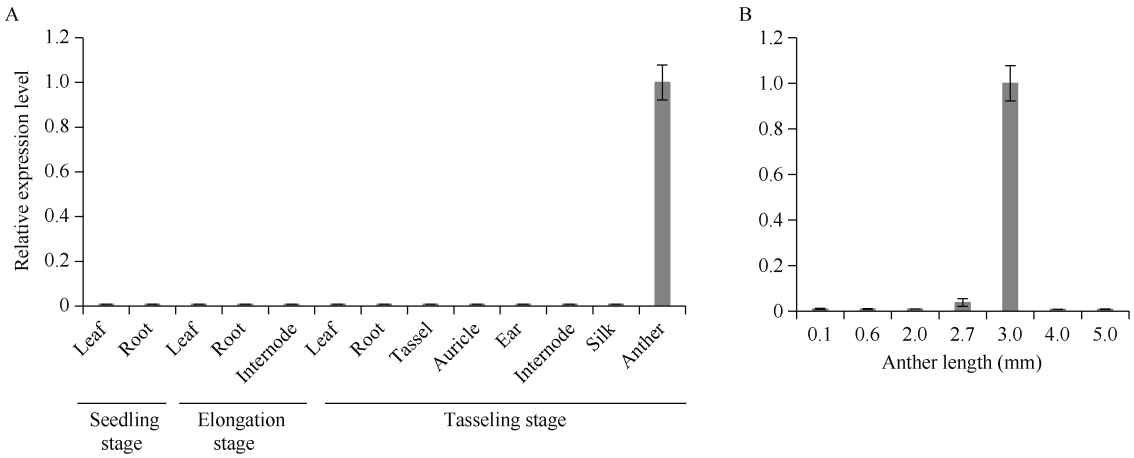


图 7 *ZmMs7* 基因在不同组织中的表达量变化

Fig. 7 Relative expression level of *ZmMs7* genes in different tissues

2.7~3.0 mm 长度(S8b~S10)花药中表达，且在 3.0 mm 单核小孢子阶段表达量最高(图 7-B)[25]，表明 *ZmMs7* 基因在四分体期和单核小孢子期的玉米花药发育中具有重要作用[26]。

3 讨论

本研究中的 *ms20s1* 属于无花粉型玉米雄性不育突变体。石蜡切片观察分析结果表明，*ms20s1* 突变体发育异常起始于花药发育的 S9 阶段，在 S11 阶段最为显著，主要表现为绒毡层细胞降解异常，小孢子细胞败育，导致无花粉粒形成。基因定位和等位测验结果表明 *ms20s1* 为已知基因 *ZmMs7* 的新等位突变。

玉米 *ZmMs7* 基因编码一个 PHD-finger 的转录因子，是玉米减数分裂后花药发育的关键调控因子[27]。植物中，PHD 是锌指结构域家族的一类转录因子，参与了胚胎到营养生长，营养生长到生殖生长中的各项生命过程[28]。在拟南芥、水稻、大麦中已鉴定出该基因的同源基因 *AtMS1*、*OsMs1*/*OsPTC1*、*HvMs1*，这些基因在雄性育性调控、细胞学表现以及时空表达上也基本相似[29-31]。其中 *AtMS1* 在减数分裂后的绒毡层中特异表达，参与花粉外壁和花粉胞质组分的形成以及绒毡层的发育，*ms1* 突变体不能进行 PCD，绒毡层细胞异常降解导致线粒体膨胀和大的自噬泡；*OsPTC1* 控制着绒毡层细胞的程序性死亡和功能花粉的发育，突变体表现为绒毡层细胞增殖失控、细胞膨胀、DNA 断裂延迟、乌氏体和花药壁发育异常。这些都表明在植物雄性器官发育过程中 PHD-finger 蛋白是至关重要的。

已有研究表明，*ms7* 突变体表现出完全隐性雄性不育，细胞学特征是小孢子壁和芽孔发育不良，绒毡层细胞发育异常，*ms7-6007* 突变体与其表现相似[27,32]。*ms20s1* 突变体在减数分裂期小孢子发育正常，在 S11 时绒毡层细胞开始肿胀，小孢子败育，且在皱缩的花药室中产生很多碎片，表明绒毡层细胞的程序性死亡降解的异常。在小孢子发育后期，*ms20s1* 突变体与 *ms7-6007* 突变体表现相同。并且 *ms7-6007* 突变体的细胞学特征与水稻 *ptc1* 突变体和拟南芥 *ms1* 突变体相似，表现出绒毡层退化延迟和花粉外壁发育缺陷[33-34]。*ZmMs7* 作为转录激活因子发挥作用，仅在花药中表达。且在花药发育的四分体期和单核小孢子期特异表达[25]。这与突变体小孢子在四分体期染色体异常浓缩变粗，绒毡层细胞直至四分体期发育都正常，但之后绒毡层细胞开始液泡化并迅速降解，花药小孢子壁和芽孔及绒毡层细胞发育异常这一现象对应[26]。

ms20s1 突变体中 *ZmMs7* 基因在第 1 个外显子上缺失 3 个碱基，并没有在重要结构域上。第 3 个外显子不同位置上有 3 个单碱基的突变，引起了 3 个氨基酸的变化，且靠近 PHD 结构域，可能影响蛋白功能；而 *ms7-6007* 突变体是在第 2 外显子有 7 个碱基插入，导致蛋白翻译发生移码，造成亮氨酸拉链区域和 PHD 结构域的缺失；此外，*ms7gl* 突变体是在第 3 外显子上插入了 1136 个碱基的转座元件，导致翻译提前终止，同样造成亮氨酸拉链区和 PHD 结构域的缺失[27]。由此对比来看，*ms20s1* 突变体的突变方式与 *ms7-6007* 突变体、*ms7gl* 突变体不同，证明 *ms20s1* 是 *ZmMs7* 基因的一个新等位突变体。我们基于 A 到 G 的 SNP 变异开发了一个 CAPS 功能标记，为 *ms20s1* 突变体不育位点向优良杂交种母本回交

转育, 以及配套的 SPT 保持系创制和制种应用奠定了基础。CAPS 标记比较直观, 但需要进行酶切和电泳, 检测效率偏低。KASP (Kompetitive Allele Specific PCR)标记检测更为方便, 通量大, 效率高, 后续将在突变位点处开发 KASP 标记以提高检测效率。

4　结论

本研究发现了一个玉米雄性不育突变体 *ms20s1*, 该突变体表现为绒毡层细胞程序性死亡异常。基因定位结果表明 *ms20s1* 是 *ZmMs7* 基因的一个新等位突变体。*ZmMs7* 基因在绒毡层细胞和小孢子的发育过程中特异表达。在 *ms20s1* 突变体中, *ZmMs7* 基因的第 3 外显子 3 个碱基的突变造成了编码氨基酸的非同义突变, 可能引起了蛋白功能的改变, 进而造成植株的雄性不育。本研究为隐性核不育系的创制提供了新的突变位点, 同时也为该位点的育种应用提供了有效的功能标记。

References

[1] Tester M, Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 2010, 327: 818–822.

[2] Wan X Y, Wu S W, Li Z W, Dong Z Y, An X L, Ma B, Tian Y H, Li J P. Maize genic male-sterility genes and their applications in hybrid breeding: progress and perspectives. *Mol Plant*, 2019, 12: 321–342.

[3] Chen L, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 579–606.

[4] Williams M E. Genetic engineering for pollination control. *Trends Biotechnol*, 1995, 13: 344–349.

[5] Wu Y Z, Fox T W, Trimnell M R, Wang L J, Xu R J, Cigan A M, Huffman G A, Garnaat C W, Hershey H, Albertsen M C. Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 1046–1054.

[6] Zhang D B, Luo X, Zhu L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development. *J Genet Genomics*, 2011, 38: 379–390.

[7] Zhang D B, Wilson Z A. Stamen specification and anther development in rice. *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 2342–2353.

[8] Scott R J, Spielman M, Dickinson H G. Stamen structure and function. *Plant Cell*, 2004, 16: S46–S60.

[9] Wang D, Skibbe D S, Walbot V. Maize *csmd1* exhibits pre-meiotic somatic and post-meiotic microspore and somatic defects but sustains anther growth. *Sex Plant Reprod*, 2011, 24: 297–306.

[10] Stieglitz H, Stern H. Regulation of beta-1,3-glucanase activity in developing anthers of Lilium. *Dev Biol*, 1973, 34: 169–173.

[11] Ariizumi T, Toriyama K. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 437–460.

[12] Hernandez-Pinzon I, Ross J H E, Barnes K A, Damant A P, Murphy D J. Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta*, 1999, 208: 588–598.

[13] Bih F Y, Wu S S, Ratnayake C, Walling L L, Nothnagel E A, Huang A H C. The predominant protein on the surface of maize pollen is an endoxylanase synthesized by a tapetum mRNA with a long 5' leader. *J Biol Chem*, 1999, 274: 22884–22894.

[14] Liu L, Fan X D. Tapetum: regulation and role in sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2013, 83: 165–175.

[15] Phan H A, Iacuone S, Li S F, Parish R W. The MYB80 Transcription factor is required for pollen development and the regulation of tapetal programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2011, 23: 2209–2224.

[16] Cui Y, Zhao Q, Xie H T, Wong W S, Wang X F, Gao C J, Ding Y, Tan Y Q, Ueda T, Zhang Y, Jiang L W. MONENSIN SENSITIVITY1 (MON1)/CALCIUM CAFFEINE ZINC SENSITIVITY1 (CCZ1)-mediated rab7 activation regulates tapetal programmed cell death and pollen development. *Plant Physiol*, 2017, 173: 206–218.

[17] Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Kondo M, Hamada K, Yano K, Nishimura M, Matsuoka M. Gibberellin modulates anther development in rice *via* the transcriptional regulation of GAMYB. *Plant Cell*, 2009, 21: 1453–1472.

[18] Skibbe D S, Wang X J, Borsuk L A, Ashlock D A, Nettleton D, Schnable P S. Floret-specific differences in gene expression and support for the hypothesis that tapetal degeneration of *Zea mays* L. occurs *via* programmed cell death. *J Genet Genomics*, 2008, 35: 603–616.

[19] Zhao D Z, Wang G F, Speal B, Ma H. The *EXCESS MICROSPOROCYTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev*, 2002, 16: 2021–2031.

[20] Fu Z Z, Yu J, Cheng X W, Zong X, Xu J, Chen M J, Li Z Y, Zhang D B, Liang W Q. The rice basic helix-loop-helix transcription factor TDR INTERACTING PROTEIN2 is a central switch in early anther development. *Plant Cell*, 2014, 26: 1512–1524.

[21] Moon J, Skibbe D, Timofejeva L, Wang C J R, Kelliher T, Kremling K, Walbot V, Cande W Z. Regulation of cell divisions and differentiation by MALE STERILITY32 is required for anther development in maize. *Plant J*, 2013, 76: 592–602.

[22] Guo Z F, Wang H W, Tao J J, Ren Y H, Xu C, Wu K S, Zou C, Zhang J N, Xu Y B. Development of multiple SNP marker panels affordable to breeders through genotyping by target sequencing (GBTS) in maize. *Mol Breed*, 2019, 39: 37.

[23] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Cano L, Kamoun S, Terauchi R. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 174–178.

[24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.

[25] Han Y J, Hu M J, Ma X X, Yan G, Wang C Y, Jiang S Q, Lai J S, Zhang M. Exploring key developmental phases and phase-specific genes across the entirety of anther development in maize.

J Integr Plant Biol, 2022, 64: 1394–1410.

[26] An X L, Ba B, Duan M J, Dong Z Y, Liu R G, Yuan D Y, Hou Q C, Wu S W, Zhang D F, Liu D C, Yu D, Zhang Y W, Xie K, Zhu T T, Li Z W, Zhang S M, Tian Y H, Liu C, Li J P, Yuan L P, Wan X Y. Molecular regulation of *ZmMs7* required for maize male fertility and development of a dominant male-sterility system in multiple species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 23499–23509.

[27] Zhang D F, Wu S W, An X L, Xie K, Dong Z Y, Zhou Y, Xu L W, Fang W, Liu S S, Liu S S, Zhu T T, Li J P, Rao L Q, Zhao J R, Wan X Y. Construction of a multicontrol sterility system for a maize male-sterile line and hybrid seed production based on the *ZmMs7* gene encoding a PHD-finger transcription factor. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 459–471.

[28] Halbach T, Scheer N, Werr W. Transcriptional activation by the PHD finger is inhibited through an adjacent leucine zipper that binds 14-3-3 proteins. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 3542–3550.

[29] Yang C, Vizcay-Barrena G, Conner K, Wilson Z A. MALE STERILITY1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell*, 2007, 19: 3530–3548.

[30] Ito T, Shinozaki K. The *MALE STERILITY1* gene of *Arabidopsis*, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in tapetal cells and is required for pollen maturation. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 1285–1292.

[31] Gomez J F, Wilson Z A. A barley PHD finger transcription factor that confers male sterility by affecting tapetal development. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 765–777.

[32] Morton C M, Lawson D L, Bedinger P. Morphological study of the maize male sterile mutant *ms7*. *Maydica*, 1989, 34: 239–245.

[33] Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, Yang C Y, Liang W Q, Zong J, Wilson Z A, Zhang D B. *PERSISTENT TAPETAL CELL1* encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice. *Plant Physiol*, 2011, 156: 615–630.

[34] Yan X J, Ma L, Pang H Y, Wang P, Liu L, Cheng Y X, Cheng J K, Guo Y, Li Q Z. METHIONINE SYNTHASE1 is involved in chromatin silencing by maintaining DNA and histone methylation. *Plant Physiol*, 2019, 181: 249–261.