

水稻雄性不育突变体 *D63* 的育性 基因遗传分析与精细定位

焦仁军, 朱柏羊, 钟萍, 王迁, 廖婷婷, 王平荣, 邓晓建

(四川农业大学水稻所, 成都 611130)

摘要: 利用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)处理籼稻品种冈46B获得雄性不育突变体*D63*, 并对该突变体进行表型鉴定、遗传分析和基因定位。结果显示*D63*突变体花药瘦小呈乳白色, 花药内完全无花粉粒, 属于无花粉型雄性不育。与野生型亲本冈46B相比,*D63*突变体成熟期株高降低了13.7%, 穗伸出度减少了266.7%, 自交结实率为0, 其他农艺性状无显著差异。遗传分析表明该不育性状受1对隐性核基因控制, 该突变基因定位于第2号染色体长臂靠近着丝粒区域InDel标记J2和J4之间, 与J2和J4的遗传距离分别为0.2 cM和0.1 cM, 该定位区间的物理距离为105.8 kb。候选基因分析结果表明,*D63*突变体在编码分泌性成束糖蛋白基因*LOC_Os02g28970*编码区第1580位碱基A突变为C, 使编码蛋白的氨基酸序列第527位组氨酸(His)突变为脯氨酸(Pro)。*D63*突变体与已报道的*mtr1*突变体表型上不同之处主要是后者花药含有败育花粉粒, 二者表型上的差异可能是由于*LOC_Os02g28970*基因序列突变位点不同, 以及它们分别属于籼、粳亚种2个不同遗传背景所致。

关键词: 水稻; 雄性不育; 核不育; 遗传分析; 基因定位

Genetic Analysis and Molecular Mapping of the Rice Male Sterile Mutant *D63*

JIAO Ren-jun, ZHU Bai-yang, ZHONG Ping, WANG Qian,

LIAO Ting-ting, WANG Ping-rong, DENG Xiao-jian

(Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130)

Abstract: In this study, the male sterile mutant *D63* was isolated from the *indica* cultivar G46B through ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenesis. Furthermore, phenotypic characterization, genetic analysis and gene mapping of the mutant were performed. As result, anthers of the *D63* mutant were smaller, thinner and milk white, and there was no pollen in its pollen sac, which belonged to non-pollen type of male sterility. During the mature period, compared with the wide-type parent G46B, plant height and panicle exertion of *D63* reduced by 13.7% and 266.7%, respectively, and selfing seed setting rate was 0. Genetic analysis indicated that male sterility of the *D63* mutant was controlled by one pair of recessive nuclear gene. The sterile gene was finally mapped between the InDel markers J2 and J4 on the long arm of rice chromosome 2. The genetic distances from the sterile gene to the two InDel markers were 0.2 cM and 0.1 cM, respectively, and the physical length of this region was 105.8 kb. Sequenceing analysis of the candidate genes in the mutant and its wild-type revealed a single-nucleotide A-to-C mutation existed in the *D63* mutant at position 1580 in coding region of the *LOC_Os02g28970* gene for secretory fasciclin glycoprotein, which resulted in an amino acid change from His at position 527 to Pro in the encoded product. The *D63* mutant had completely no pollen grain in its anthers, but the reported *mtr1* mutant had abortive pollen grains. The different pheno-

收稿日期: 2015-06-15 修回日期: 2015-07-18 网络出版日期: 2016-04-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160406.1405.024.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31171533, 31471473, 91335107); 四川省科技计划(2012NZ0027, 2014JY0056)

第一作者研究方向为水稻遗传分析及分子育种。E-mail: brucelee-jrj@qq.com

通信作者: 邓晓建, 主要从事水稻遗传育种及分子生物学研究。E-mail: xjdeng2006@aliyun.com

types of the two mutants may be caused by different mutational sites of the base sequence of *LOC_Os02g28970* gene, or different genetic backgrounds of the two subspecies, because the two mutant belonged to *indica* and *japonica* subspecies, respectively.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); male sterility; genic male sterility; genetic analysis; gene mapping

雄性不育 (MS, male sterility) 是广泛存在于开花植物中的一种较常见的现象, 是雄性性器官发育不良, 不能形成正常的花药花粉或仅能形成无生活力败育的花粉, 但雌性器官正常且可育的特性^[1]。在高等植物中, 约有 43 个科 162 个属 620 个物种具有雄性不育现象^[2]。雄性不育为作物的杂种优势利用创造了有利条件, 因而雄性不育突变体的相关研究对丰富不育基因种质资源、提高农作物产量、品质、抗逆性以及抗病虫性有着重要的现实意义。特别是在水稻中, 通过“三系法”和“两系法”杂种优势的利用, 大幅提高了我国水稻单位面积产量, 为解决我国粮食安全问题提供了有力的保障。

在花粉粒形成过程中, 花粉母细胞通过减数分裂形成小孢子, 由绒毡层释放胼胝质酶, 分解四分体小孢子周围的胼胝质壁, 小孢子从四分体中游离出来, 释放到花粉囊中, 小孢子再通过有丝分裂, 最终发育成含 2 个精核和 1 个营养核的三核花粉粒即成熟花粉粒。在花粉发育的整个过程中, 任何参与雄蕊发育^[3]、孢原细胞分化^[4]、小孢子减数分裂^[5-9]、花粉囊和花粉外壁发育^[10-15]、调控绒毡层发育^[16-19]和胼胝质沉积^[20-22]相关基因发生突变都可能导致雄性不育发生。据国家水稻数据中心 (<http://www.ricedata.cn/gene/index.htm>) 统计, 目前已定位的水稻不育基因遍布 12 条染色体上。这些基因绝大部分为隐性核不育基因且均与雄蕊发育、孢原细胞分化、小孢子减数分裂、花粉囊与花粉外壁发育、绒毡层发育及降解等相关。本研究利用化学诱变剂甲基磺酸乙酯 (EMS) 处理籼型杂交水稻骨干亲本保持系冈 46B 获得一份雄性不育突变体 *D63*, 对该突变体进行表型鉴定和花粉形态观察、遗传分析、基因定位以及候选基因分析, 有助于探明水稻雄性不育分子机理和丰富不育基因资源, 为该突变基因的育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

用 EMS 处理籼稻保持系材料冈 46B, 在 M_2 发现编号为 *D63* 的一个株系分离出较多的雄性不育株。从该株系选择正常结实的可育株, 分单株收种并分

别种成 M_3 株系, 发现部分 M_3 株系中继续分离出较多的雄性不育株, 于是, 从分离株系中继续选择正常结实的可育株, 通过杂合保存的方式来保存该雄性不育突变体, 并将该突变体暂命名为 *D63*。将 *D63* 不育植株分别与野生型亲本冈 46B (G46B) 和粳稻品种中花 11 (ZH11) 杂交, 构建 F_2 分离群体, 用于该雄性不育突变体的遗传分析和基因定位。*D63*、冈 46B 和中花 11 等材料均由四川农业大学水稻研究所提供。

1.2 突变体外观形态观察、花粉育性鉴定和主要农艺性状调查

2011-2014 年, 将 *D63* 突变体与 G46B、ZH11 杂交, 在海南陵水和四川成都种植亲本和 F_1 , 同时种植 F_2 群体。田间种植每行 10 株, 行株距 16.6 cm × 23.3 cm, 田间管理措施按常规大田管理进行。抽穗期开始进行育性调查, 田间观察鉴定并标记不育植株, 对其成熟颖花进行取样并在解剖镜下进行观察; 将 *D63* 不育突变植株和 G46B 的花药制作成玻片标本对比观察, 用 KI-I₂ 染色法在显微镜下观察花粉有无以及染色情况, 以评价突变体败育类型。成熟期调查 *D63* 突变体及野生型亲本 G46B 的主要农艺性状, 包括株高、剑叶长、剑叶宽、每株穗数、穗伸出度、每穗粒数、结实率和千粒重 (*D63* 突变体千粒重为突变体与 G46B 异交结实测得) 等。此外, 对 F_2 群体中不育植株和可育植株分离情况进行统计, 以进行遗传分析。

1.3 定位群体构建和 DNA 提取

根据育性调查与分析结果, 在海南陵水从 (*D63*/ZH11) F_2 群体中, 选取 44 株可育株和 88 株不育株组成初步定为群体, 分单株提取叶片 DNA, 并选取育性正常植株 10 株, 突变型不育株 10 株, 各取等量叶片用于构建正常基因池和突变基因池。为缩小定位区间, 在四川成都扩大种植 (*D63*/ZH11) F_2 群体, 通过田间鉴定共选取 1069 株不育单株, 分单株提取叶片 DNA 作为精细定位群体。参考 S. R. McCouch 等^[23] 的方法提取水稻叶片中的 DNA。

1.4 分子标记分析和遗传连锁图谱构建

SSR 标记引物参照 <http://www.gramene.org/>

microsat, InDel 标记引物为利用 Primer 5.0 软件自行设计,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。PCR 扩增体系参照 O. Panaud^[24], 扩增产物用 3%~5% 琼脂糖凝胶在 0.5 × TBE 缓冲液中 120~140 V 电泳 2 h 左右,用凝胶扫描成像系统记录电泳分离结果。将具有野生型亲本带型标记为“1”,突变体亲本带型标记为“2”,双亲杂合带型记为“3”。利用 maqmaker 3.0 软件对分离群体的标记进行连锁分析,用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离 (centimorgan, cM), 构建目标基因所在区域的分子标记连锁图谱。

1.5 候选基因的遴选与测序

根据 *D63* 突变体的突变性状,以及分子标记与目的基因的遗传距离,利用水稻基因组数据库数据 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>),对突变基因精细定位的染色体区段内的候选基因进行遴选。通过设计候选基因序列的引物,分别对 *D63* 突变体和野生型亲本 G46B 中预测基因序列进行扩增、测序和序列比对,最终确定突变位点和候选基因。样品送北京六合华大科技股份有限公司进行测序,每个片段重复 3 次,每个样品每次重复 2 次,以保证测序结果准确可靠。

2 结果与分析

2.1 突变体花粉育性、形态特征及主要农艺性状表现

通过田间调查发现,*D63* 突变体在海南陵水春季和四川成都夏、秋季抽穗均表现雄性不育,表明该突变体雄性不育性状不受光照和温度影响,属于普通核不育类型。*D63* 突变体在抽穗开花期,雌性器官正常可育,雄性器官花药数量为正常的 6 枚,但花丝细长,花药干瘪并呈乳白色,而野生型亲本在抽穗开花期花丝粗壮,花药饱满呈黄色(图 1);碘染法试验镜检结果显示,捣碎 *D63* 突变体花药,未见花粉粒,而野生型亲本含有大量染色正常的花粉粒(图 2B),表明 *D63* 突变体是典型的无花粉型雄性不育。成熟期,*D63* 突变体套袋自交结实率为 0(表 1),进一步验证了 *D63* 突变体的雄性不育特性。成熟期主要农艺性状调查结果显示,与野生型亲本 G46 相比,*D63* 突变体群体穗子均不能完全从叶鞘中抽出即表现为包茎,穗伸出度相应的减少了 266.7%,株高降低了 13.7%,其他农艺性状如每株穗数、每穗总粒数、千粒重(突变体千粒重为异交结实千粒重)、剑叶长和剑叶宽无显著差异(表 1,图 1A、B)。

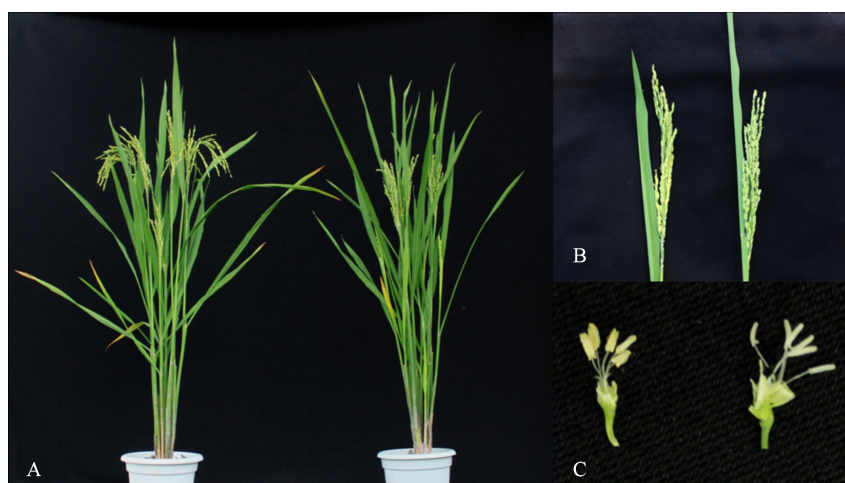


图 1 *D63* 突变体(右)与野生型亲本 G46B(左)的植株(A)、穗子(B)和雌雄蕊(C)形态特征比较

Fig. 1 Plant(A), panicle(B), pistil and staminate(C) phenotypes of the *D63* mutant(right) and its wild-type G46B(left)

2.2 突变性状的遗传分析

将雄性不育突变体 *D63* 分别与正常品种 G46B 和 ZH11 杂交,根据 F_1 、 F_2 植株表型对该突变性状进行遗传分析。调查结果表明, F_1 植株均表现为可育, F_2 群体中可育植株和不育植株分离明显,经 χ^2 检验,2 种类型植株数分离比符合 3:1(表

2),表明 *D63* 不育性状受 1 对隐性核基因控制。G46B 与 *D63* 突变体实质上构成了一个由雄性不育基因所组成的近等基因系,因此,通过与野生型亲本 G46B 比较可以得出,雄性不育突变群体植株穗包茎和株高变矮是由这对隐性核基因突变所造成的。

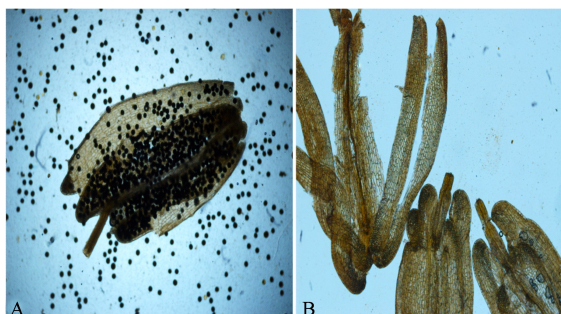


图2 *D63* 突变体(B)与野生型亲本 G46B(A)的花药 KI-I₂ 染色

Fig. 2 Anthers of the *D63* mutant (B) and its wild-type G46B (A) by KI-I₂ staining

2.3 突变基因的分子标记定位

以雄性不育突变体 *D63* 和正常品种 ZH11 杂交的 F₂ 群体为定位群体,用均匀分布在水稻 12 条染色体上的 SSR 引物对亲本 *D63* 和 ZH11 以及构建的近等基因突变池和正常池进行多态性筛选,用具有多态性的 SSR 引物对亲本 *D63* 和 ZH11 以及 F₂ 单株的 DNA 进行扩增。结果发现,位于水稻第 2 染色体长臂靠近着丝粒附近的 2 个 SSR 标记 RM300 和 RM341 与目标基因存在连锁关系,遗传距离分别为 3.6 cM 和 10.2 cM(图 3A)。为实现目标基因的精细定位,根据 NCBI 数据库中粳稻品种日本晴和籼稻品种 9311 之间的序列差异性设计了 5 对多态性 InDel 标记(表 3),最终将不育目标基因定位在 InDel 标记 J2 和 J4 之间,遗传距离分别为 0.2 cM 和

表 2 *D63* 突变体与正常亲本杂交 F₂ 群体的育性分离

Table 2 Segregation of male sterility in F₂ population from the crosses of the *D63* mutant and normal parents

杂交组合 Cross combination	总株数 Total number of plants	可育株数 Number of fertile plants	不育株数 Number of sterile plants	期望比 Excepted ratio	χ^2	<i>P</i>
<i>D63</i> /G46B	880	648	232	3:1	0.80	0.25 ~ 0.50
<i>D63</i> /ZH11	4200	3131	1069	3:1	0.43	0.50 ~ 0.75

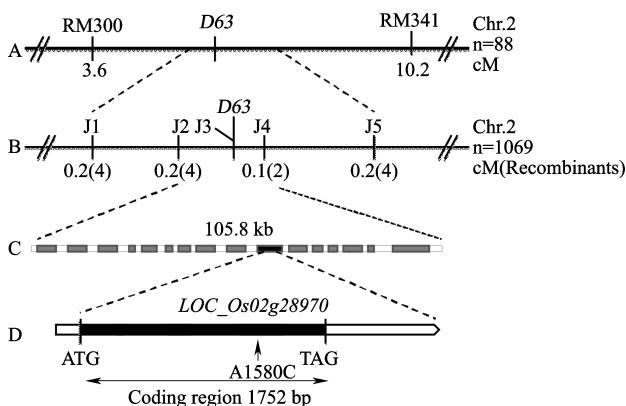


图3 突变基因在水稻第 2 染色体长臂上的分子连锁图
Fig. 3 Linkage map of the mutant gene on the long arm of rice chromosome 2

0.1 cM,此染色体区间的物理距离约为 105.8 kb,并且 J3 标记与不育基因表现为共分离(图 3B)。

表 1 *D63* 突变体与野生型亲本 G46B 主要农艺性状比较
Table 1 Comparison of major agronomic traits between the *D63* mutant and its wild-type parent G46B

性状 Trait	G46B(CK)	<i>D63</i>	比对照增减(%) Compared with CK
株高(cm) Plant height	92.9 ± 2.6	80.2 ± 2.5	-13.7*
每株穗数 No. of productive panicle per plant	6.5 ± 1.1	7.0 ± 1.3	7.6
穗长(cm) Panicle length	22.6 ± 1.7	20.8 ± 1.9	-7.9
穗伸出度(cm) Panicle exertion	4.5 ± 1.3	-7.5 ± 1.7	-266.7*
剑叶长(cm) Flag leaf length	26.7 ± 2.6	26.8 ± 2.2	0.4
剑叶宽(cm) Flag leaf width	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.3	-4.2
每穗总粒数 No. of spikelets per panicle	198.6 ± 9.8	186.6 ± 12.0	-6.0
结实率(%) Seed setting rate	79.8 ± 1.0	0	-79.8*
千粒重(g) 1000-grain weight	26.6 ± 0.4	26.3 ± 0.4	-1.1

* 表示在 0.05 水平上差异显著

* Significantly different at 0.05 probability level

表 3 本研究设计的多态性 InDel 标记

Table 3 Polymorphic InDel markers developed in this study

标记 Marker	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(3'-5')
J1	CTCTTCCTCCTTTCTTT	AGTTGATTCATTCCCTTG
J2	CAGGGCAGAGCAGAAGAG	CGCTGATGATGTGGTTAAAC
J3	GCTGGCTTATAGTCTGCT	GTCAATGTCACCTCCTCC
J4	TTGCGGTCACCAAAGATA	CCACAATAATCGCAGCAG
J5	GTTGTGCGGTATGTAAC	CAATCAAGAAATGCCTC

2.4 突变基因的候选基因分析和测序验证

有些编码成束糖蛋白 (Fasciclin glycoprotein) 或具有成束糖蛋白结构域的基因在雄性生殖细胞中特异表达,产生的成束糖蛋白作为粘附分子调节生殖细胞和周围体细胞之间的信息传递,编码该蛋白的基因突变可引起小孢子和绒毡层发育缺陷,最终造成育性显著降低甚至完全雄性不育^[25-26]。而在上述 InDel 标记 J2 和 J4 之间 105.8 kb 的定位区间内共有 16 个预测基因(图 3C,表 4),其中包含编码一个分泌性成束糖蛋白 (Secretory fasciclin glycoprotein) 的 *LOC_Os02g28970* 基因。该基因全长 3306 bp,其中包含了 1752 bp 连续的外显子和上、下游分别

为 55 bp 和 1499 bp 的 UTR,该基因编码的蛋白具有成束糖蛋白的 2 个成束结构域 H1 和 H2。再根据 InDel 标记 J2 和 J4 与 *D63* 不育突变基因的交换植株数,首先选择 *LOC_Os02g28970* 基因作为可能的候选基因。分别从 *D63* 突变体和野生型亲本 G46B 中扩增出该基因序列进行测序,结果表明,*D63* 突变体在 *LOC_Os02g28970* 基因编码区第 1580 个碱基 A 突变成 C,造成编码分泌性成束蛋白的第 527 位组氨酸 (His) 突变为脯氨酸 (Pro) (图 3D),故认为很可能是该基因在化学诱变处理过程中发生点突变造成 *D63* 的不育突变表型。

表 4 水稻第 2 号染色体定位区间内预测基因及其功能

Table 4 Gene names and their putative functions in the target interval

基因名 Gene name	预测功能 Putative function
<i>LOC_Os02g28880</i>	Hypothetical protein
<i>LOC_Os02g28890</i>	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass
<i>LOC_Os02g28900</i>	Cytokinin-O-glucosyltransferase 2, putative, expressed
<i>LOC_Os02g28910</i>	Expressed protein
<i>LOC_Os02g28920</i>	Transposon protein, putative, unclassified, expressed
<i>LOC_Os02g28930</i>	Expressed protein
<i>LOC_Os02g28940</i>	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass
<i>LOC_Os02g28950</i>	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass, expressed
<i>LOC_Os02g28960</i>	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass, expressed
<i>LOC_Os02g28970</i>	Fasciclin glycoprotein, expressed
<i>LOC_Os02g28980</i>	Peptidyl-prolyl isomerase, putative, expressed
<i>LOC_Os02g28990</i>	Expressed protein
<i>LOC_Os02g29000</i>	Cupin domain containing protein, expressed
<i>LOC_Os02g29010</i>	Retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed
<i>LOC_Os02g29020</i>	Cupin domain containing protein, expressed
<i>LOC_Os02g29030</i>	Retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed

3 讨论

经查询国家水稻数据中心 (<http://www.ricedata.cn/gene>), 目前水稻第 2 号染色体上已报道的雄性核不育基因有 *tms4*、*tms5*、*tms9*、*ptgms2-1*、*MTR1*、*TDR*、*API5*、*RCK* 和 *MER3* 等 9 个, 其中 *tms4*、*tms5*、*tms9* 和 *ptgms2-1* 为光温敏雄性不育基因, *TDR* 和 *API5* 为调控绒毡层发育相关基因, *RCK* 和 *MER3* 为减数分裂相关基因, 它们的突变都能导致水稻花粉育性显著降低甚至完全不育。*MTR1* 为编码分泌性成束糖蛋白的基因, 在雄性生殖细胞中表达, 发生突

变后导致绒毡层和小孢子发育缺陷从而导致突变体表现为完全的雄性不育^[26]。

应该指出, *mtr1* 突变体与本研究中雄性不育突变体 *D63* 为同一个基因的不同位点突变。在 H. Tan 等^[26] 的研究中, *mtr1* 突变体由粳稻品种 9522 经 ⁶⁰Co- γ 射线诱变而来, 它能够进行正常的营养生长, 在生殖生长阶段能够形成较小且呈浅黄色的花药, 但不能产生有活力的正常花粉粒, 其碘染法实验镜检结果显示, 视野中可以看见碘败型花粉粒。通过序列分析结果表明, *mtr1* 突变体是在 *LOC_Os02g28970* 基因编码区插入 A 碱基移码造成该雄

性不育表型。而在本研究中,通过 EMS 处理籼稻品种 G46B 产生的雄性不育突变体 *D63*,花药细小而呈乳白色,碘染法实验镜检结果表明 *D63* 突变体属于典型的无花粉型不育,这与 *mtr1* 突变体的表型明显不同。通过序列分析的结果表明,*D63* 的突变位点位于基因 *LOC_Os02g28970* 编码区第 1580 个碱基 A 突变为 C 碱基,导致编码蛋白的氨基酸序列第 527 位的组氨酸(His)突变为脯氨酸(Pro),而该位点恰好为表达成束蛋白保守结构域 H2 上,造成该雄性不育表型。由上可知,*mtr1* 和 *D63* 突变体表型的差异,可能是由于 *LOC_Os02g28970* 基因序列突变位点不同,以及它们分别属于粳稻和籼稻 2 个不同遗传背景所致。

目前,“三系法”杂种优势利用因为“恢保”关系严格,极大地限制了更强优势杂交稻的培育。相对而言,“两系法”杂种优势利用不受“恢保”关系限制,配组更自由^[27],培育品质好、抗性强的强优势杂交组合的潜力更大。因此,在生产上“两系法”呈现加快发展的趋势。但由于“两系法”所用的光温敏核不育系在实际生产中,一方面受到温度等环境因素复杂多变的制约,另一方面核不育系本身在遗传上存在不育起点温度漂移现象,两系法杂交制种存在一定的风险^[28],这在一定程度上制约着“两系法”的更快发展。水稻普通的隐性核不育基因可应用于轮回育种,但还未直接应用于杂交稻生产实践,主要原因是由于缺乏有效的不育系繁殖体系。近年来美国杜邦先锋公司发明了一项杂交种子生产技术——SPT 技术(seed production technology),这项技术是将花粉育性恢复基因、花粉致死基因和筛选标记基因构建在同一个二元载体以实现紧密连锁,然后转入到相应的核不育系中,获得该不育系的保持系;该转基因株系自交可以获得不育系和保持系 2 种类型的种子,通过荧光筛选技术可以将保持系种子筛选出来,用于繁殖后代,分离的不育系种子不含转基因成分,可用于杂交育种和制种,从而有效解决了隐性核不育系的保持和繁殖难题,实现一系两用^[29-30]。据我国科学技术部 2010 年发表公告,在“863”计划支持下于 2009 年启动的“水稻智能不育分子设计技术研究及新型不育系的创制”重点项目,利用 SPT 技术已初步建立了水稻智能不育分子设计育种体系(http://www.most.gov.cn/kjbgz/201009/t20100920_82153.htm)。待体系建立完备,一方面对水稻隐性雄性不育基因的利用率将大大提高,缩短育种周期;另一方面,也避免了转基因作物

所存在的生物安全问题,届时隐性核不育基因将有广阔的应用前景。*D63* 突变体的育性不受光温影响,属于无花粉型败育类型,且该突变的发生对分蘖数、穗粒数、异交结实率、千粒重、剑叶长和叶宽等主要农艺性状影响不显著,因此可能具有重要的潜在应用价值。

参考文献

- [1] 张天真. 作物育种学总论[M]. 北京:中国农业出版社,2003
- [2] Kaul M L H. Male Sterility in Higher Plants[M]. Berlin:Springer-Verlag,1988
- [3] Ma H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and megasporogenesis in flowering plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 2005,56:393-434
- [4] Glover J, Grelon M, Craig S, et al. Cloning and characterization of MS5 from *Arabidopsis*; a gene critical in male meiosis[J]. Plant J, 1998, 15(3):345-356
- [5] Nonomura K I, Nakano M, Fukuda T, et al. The novel gene *HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1* of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis[J]. Plant Cell, 2004, 16(4): 1008-1020
- [6] Nonomura K I, Morohoshi A, Nakano M, et al. A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice[J]. Plant Cell, 2007, 19(8):2583-2594
- [7] Wang M, Wang K, Tang D, et al. The central element protein ZEP1 of the synaptonemal complex regulates the number of crossovers during meiosis in rice[J]. Plant Cell, 2010, 22(2): 417-430
- [8] Wijeratne A J, Chen C, Zhang W, et al. The *Arabidopsis thaliana* *PARTING DANCERS* gene encoding a novel protein is required for normal meiotic homologous recombination[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(3):1331-1343
- [9] Wu Y, Hershey H. Nucleotide sequences mediating plant male fertility and method of using same patent; America, 8013218[P]. 2011-09-06
- [10] Li H, Pinot F, Sauveplane V, et al. Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the ω -hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice[J]. Plant Cell, 2010, 22(1):173-190
- [11] Shi J, Tan H, Yu X H, et al. Defective pollen wall is required for anther and microspore development in rice and encodes a fatty acyl carrier protein reductase[J]. Plant Cell, 2011, 23(6): 2225-2246
- [12] Hu L, Liang W, Yin C, et al. Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development[J]. Plant Cell, 2011, 23(2):515-533
- [13] Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, et al. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence[J]. Plant Cell, 2005, 17(11):2993-3006
- [14] Jung K H, Han M J, Lee D Y, et al. Wax-deficient anther1 is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development[J]. Plant Cell, 2006, 18(11): 3015-3032
- [15] Albertsen M C, Fox T W, Garnaat C W, et al. Male tissue-preferred regulatory sequences of *Ms45* gene and method of using same patent; America, 7154024[P]. 2006-10-26
- [16] Jung, K H, Han M J, Lee Y S, et al. Rice undeveloped tapetum1 is a major regulator of early tapetum development[J]. Plant Cell, 2005, 17(10):2705-2722

- [17] Zhang D S, Liang W Q, Yuan Z, et al. Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development [J]. *Mol Plant*, 2008, 1(4):599-610
- [18] Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, et al. *PERSISTENT TAPETAL CELL1* encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(2):615-630
- [19] Li X W, Gao X Q, Wei Y, et al. Rice APOPTOSIS INHIBITOR5 coupled with two DEAD-box adenosine 5'-triphosphate-dependent RNA helicases regulates tapetum degeneration [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4):1416-1434
- [20] Chen R, Zhao X, Shao Z, et al. Rice UDP-Glucose pyrophosphorylase1 is essential for pollen callose deposition and its cosuppression results in a new type of thermosensitive genic male sterility [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(3):847-861
- [21] Teng N, Huang Z, Mu X, et al. Microsporogenesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition [J]. *Flora*, 2005, 200(3):256-263
- [22] Zhu J, Chen H, Li H, et al. Defective in tapetal development and function 1 is essential for anther development and tapetal function for microspore maturation in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2008, 55(2):266-277
- [23] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 76:815-829
- [24] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Mol Gene Genet*, 1996, 252(5):597-607
- [25] Li J, Yu M, Geng L L, et al. The Fasciclin-like arabinogalactan protein gene, *FLA3*, is involved in microspore development of *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2010, 64(3):482-497
- [26] Tan H, Liang W, Hu J, et al. MTR1 encodes a secretory fasciclin glycoprotein required for male reproductive development in rice [J]. *Dev Cell*, 2012, 22(6):1127-1137
- [27] 卢兴桂, 顾名洪. 两系杂交稻理论与技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2001
- [28] 唐文帮, 陈立云, 王建龙, 等. 水稻温敏型两用核不育系繁殖存在的问题及解决办法 [J]. *杂交水稻*, 2011, 26(5):25-29
- [29] Hondred D, Young J K, Brink K, et al. Plant genomic DNA flanking SPT event and methods for identifying SPT event; America, 20090210970 [P]. 2009-08-20
- [30] 马西青, 方才臣, 邓联武, 等. 水稻隐性核雄性不育基因研究进展及育种应用探讨 [J]. *中国水稻科学*, 2012, 26(5):511-520