

玉米雄性不育突变体 *ms20s2* 的表型鉴定与基因定位

周玉强^{1,2}, 曹泉雄², 王婧², 刘伊凡², 王红武², 李坤², 刘小刚², 黄长玲², 李树强³, 刘小龙³,
张亚男³, 于飞荣³, 马庆¹, 胡小娇²

(¹安徽农业大学生命科学院 / 作物抗逆育种与减灾国家地方联合工程实验室, 合肥 230036; 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; ³新疆华夏农业有限公司, 乌鲁木齐 830000)

摘要: 玉米突变体 *male-sterile 20s2* (*ms20s2*) 是在玉米自交系 KWS49 中发现的一个无花粉型雄性不育突变体。与野生型相比, *ms20s2* 突变体花药细小且颜色偏浅, 花药内未观察到花粉。扫描电镜观察表明, 与野生型相比, 9 叶期突变体 *ms20s2* 的花药中未观察到正在减数分裂的花粉母细胞; 抽雄后突变体花药壁外部角质层形成异常, 内部未观察到乌式体结构。观察不同发育阶段花药的石蜡切片发现, 在 S6-S7 时期, 与野生型相比, *ms20s2* 突变体花药部分中间层和绒毡层细胞发生异常分裂, 导致花药壁萎缩, 花粉母细胞无法正常进行减数分裂, 最终造成花粉母细胞死亡, 产生雄性不育表型。遗传分析表明, 突变体 *ms20s2* 的雄性不育表型受单个隐性核基因控制。利用玉米 10K SNP 芯片对 F₂ 定位群体进行基因型分析, 初步将该突变位点定位在玉米 2 号染色体长臂上 6.21 Mb 区段内。进一步精细定位将该区间缩小到了 590 kb, 区间包含一个已知的蛋白编码基因 *MS32* (*Zm00001eb106620*)。对 *MS32* 基因进行测序分析, 在突变体 *MS32* 基因 4 号外显子上发现了一段 3166 bp 的大片段插入, 可能影响了 *MS32* 蛋白功能, 造成 *ms20s2* 的花药发育异常和雄性不育的表型。等位测验结果表明, 突变体 *ms20s2* 是雄性不育基因 *MS32* 的新等位突变体。组织表达分析发现该基因在玉米花药中特异表达, 且仅在花药发育的 S6 和 S7 时期表达量较高, 进一步验证了该基因在玉米花药绒毡层和中间层细胞发育过程中的重要作用。

关键词: 玉米; 突变体 *ms20s2*; 雄性不育; 基因定位; 表型分析

Phenotypic Identification and Genetic Mapping of Male Sterility Mutant *ms20s2* in Maize

ZHOU Yuqiang^{1,2}, CAO Xiaoxiong², WANG Jing², LIU Yifan², WANG Hongwu², LI Kun², LIU Xiaogang², HUANG Changling², LI Shuqiang³, LIU Xiaolong³, ZHANG Yanan³, YU Feirong³, MA Qing¹, HU Xiaojiao²
(¹School of Life Sciences, Anhui Agricultural University / National Engineering Laboratory of Crop Stress Resistance Breeding, Hefei 230036; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Engineering Research Center of Crop Molecular Breeding, Beijing 100081; ³Xinjiang Hua Xia Agricultural Co., Ltd, Urumqi 830000)

Abstract: The maize *male-sterile 20s2* (*ms20s2*) is a pollen-free genic male sterility mutant that was identified in maize inbred line KWS49. Compared with wild type (WT), the mutant anthers were small and whitish without pollen grains. The scanning electron microscopy (SEM) observations showed that no pollen mother cells undergoing meiosis were observed in the anthers of the *ms20s2* at V9 stage. The anther cuticular was abnormal, and failed to generate ubisch bodies on the inner surface of the anther wall of *ms20s2* at tasseling stage. By analyzing the paraffin sections of anthers from different developmental stages, some middle layer cells and tapetum cells of the *ms20s2* anther underwent abnormal division from S6 to S7 stages compared to WT,

收稿日期: 2023-05-21 修回日期: 2023-08-04 网络出版日期: 2023-09-19

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230521001>

第一作者研究方向为作物遗传育种, E-mail: zhouyuqiang1997@163.com

通信作者: 胡小娇, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: huxiaojiao@caas.cn

马庆, 研究方向为玉米分子遗传育种, E-mail: mqmmq@126.com

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD1200802); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ZDRW202004)

Foundation projects: National Key Research and Development Program of China (2022YFD1200802); Agricultural Science and Technology Innovation Program of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ZDRW202004)

leading to the anther wall shrinking, abnormal meiosis and death of the pollen mother cells, and finally male sterility. The segregation analysis in an F_2 population revealed that the male sterility of the *ms20s2* mutant was controlled by a single recessive nuclear gene. By genotyping with the maize 10K SNP chip, the causal gene was preliminarily mapped to the 6.21 Mb region on the long arm of chromosome 2. The physical interval was further delimited to 590 kb, where a known protein-coding gene *MS32* (*Zm00001eb106620*) is present. Sequencing analysis of the *MS32* gene revealed a 3166 bp insertion in the exon 4 of *ms20s2*, and this insertion might result in abnormal anther development and male sterility. Allelism test showed that the *ms20s2* was a new allelic variation of maize male sterile gene *MS32*. The *MS32* gene was expressed in maize anthers at S6 and S7 stages, which provided additional evidence in regulating the development of tapetum and middle layer of maize anthers.

Key words: maize; *ms20s2* mutant; male sterility; gene mapping; phenotypic analysis

植物因雄性器官发育异常,无法产生有功能的花粉,最终导致植物丧失雄性育性的现象被称作雄性不育(MS, male sterility)^[1]。玉米因其雌雄异位异花的特性,是研究植物雄性不育的优质材料。根据造成不育性状的遗传方式的差异,可以将玉米雄性不育分为细胞质雄性不育、细胞核雄性不育和核质互作雄性不育3种类型^[2],其中细胞核雄性不育的突变体及其调控基因是当前的研究热点。

玉米花药的发育和花粉的形成是一个受到精确调控的复杂过程。玉米花药发育的过程划分为14个时期(S1~S14)^[3-4],对应4个发育生物学阶段,分别是孢原细胞的分化、花药壁的形成、花粉母细胞减数分裂以及花粉粒的成熟和释放^[5-6]。花药发育S1期,雄蕊原基分化产生3个细胞层L1、L2和L3。S2期,L1发育为花药外壁(EP, epidermis),L2细胞层分化出初生周缘细胞(PPC, primary parietal cell)和孢原细胞(AR, archesporial cell)^[7]。花药发育的S3~S5阶段,初生周缘细胞分化花药内皮(EN, endothecium)和次生周缘细胞(SPC, secondary parietal cell),次生周缘细胞依次分化出中间层(ML, middle layer)和绒毡层(TA, tapetum)细胞。S6~S7阶段,经过平周分裂后,花药壁形成由外至内的花药外壁、花药内皮、中间层和绒毡层四层细胞结构,并通过纵向分裂伸长,而药室内的孢原细胞发育为花粉母细胞(PMC, pollen mother cell)并开启减数分裂的进程^[8]。花粉母细胞在S8阶段开始减数分裂,S8a第一次减数分裂形成二分体(Dy, dyad),S8b第二次减数分裂形成四分体(Tds, tetrads)。到S9时期,减数分裂完成后,单倍体小孢子(Msp, microspore)释放。S10~S11时期,绒毡层降解,产生大量乌式体,小孢子细胞液泡化体积膨大。S12时期小孢子第二次有丝分裂产生三核花粉粒。S13时期,花粉粒的

外壁逐渐发育成型,形成成熟的花粉粒^[9]。在花药发育的最后阶段S14,花药壁开裂,花粉粒被释放出去,花药也就完成了其作为玉米雄性器官的使命。而在花粉母细胞发育到成熟花粉粒的整个过程中,花药内皮、中间层和绒毡层参与维持花药壁和小孢子生长发育所需的物质的合成和转运^[8,10]。在花粉壁形成前,绒毡层通过细胞程序性死亡自我解体将营养物质全部释放到药室中^[11]。花粉粒成熟后,能够在花药壁内侧观察到斑点状的乌式体结构^[12]。

目前玉米中已发现众多参与花药发育调控的核基因,这些基因在花药发育的不同时期发挥调控作用。在花药发育早期,*MSCA1*编码一种植物特有的CC型谷氧还蛋白,通过调整细胞的氧化还原状态,引发孢原细胞的分化,玉米*mscal*突变体花药异常发育成叶状结构,而水稻中的同源基因*MIL1*也具有相似功能,突变体无法产生小孢子^[13-14];孢原细胞形成后,*MAC1*编码一种分泌蛋白配体,对花药壁的分化起到关键作用,*MAC1*在抑制孢原细胞分裂的同时促进附近的初生周缘细胞分化成花药内皮和次生周缘细胞^[6,15-17]; *OCL4*会在花药内皮形成后抑制其细胞分裂,*ocl4*突变体出现花药内皮发育异常,产生多余的细胞层。MS23、MS32、BHLH51、BHLH122是一系列BHLH家族转录因子,在绒毡层和中间层形成过程中起到调控作用。MS23可以激活BHLH51和BHLH122的表达,并与二者相互作用,调控中间层和绒毡层的形成,*ms23*突变体在中间层和绒毡层中间产生多余的一层细胞^[18];MS32也能够促进BHLH122的表达并与其形成二聚体。此外,*MS9*编码一种R2R3型MYB转录因子,该基因在花药发育的S6和S9时期表达,*ms9*和*ms32*突变体的花药中间层和绒毡层细胞发生异常分裂^[19-20]。

在花药发育的中后期, 绒毡层内的脂质代谢对花药外壁角质层以及花粉外壁的形成都有促进作用, 如花粉壁重要组成成分孢粉素, 其合成非常依赖绒毡层的参与^[11]。减数分裂、小孢子发育以及花药角质层的发育过程伴随着大量的脂质和糖类物质消耗, 此时花营的营养活动十分活跃, 多个雄性不育基因突变体被鉴定出花药代谢缺陷^[21-23]。*ZmMS33* 编码磷酸甘油酰基转移酶 (GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase), 其促进甘油磷酸脂的从头合成, 在花药发育的 S5、S6、S9 阶段都有表达, 玉米 *ms33* 突变体的花药在 S9 后停止生长, 无法产生花粉, 光合作用测定和脂质含量检测说明 *MS33* 缺失严重影响了花营的糖类和脂质物质合成, 最终导致花营生长停滞, 小孢子死亡^[23-25]。*ZmMS8* 编码 β -1, 3-半乳糖基转移酶, 参与花营生长所需的 II 型阿拉伯半乳糖的合成^[26]; *ZmMS6021* 编码 ACP 还原酶, 能将脂肪酰-ACP 还原为脂肪醇^[27]; *ZmMS26* 参与孢粉素生物合成途径中脂肪酸的羟基化^[28]; *ZmMs30* 编码一种 GDSL 脂肪酶^[29], *ZmMS44* 编码一种运输脂质前体的脂质转移蛋白 (LTP, lipid transfer protein)^[30], 它们都参与花营外壁角质层的形成; *ZmMs2/ZmABCG26* 编码一个 ABCG 转运蛋白, 参与孢粉素与色氨酸的转运^[31-32]。*ZmMS7* 主要在花营发育的 S8 时期后表达, 编码 PHD-finger 转录因子, 通过与 NF-Y 形成复合物激活下游转录因子的表达, 从而参与调控绒毡层的 PCD 过程, 并促进花粉粒的发育^[33-35]。综上, 花营及花粉发育是植物生命周期中最重要也是最复杂的环节之一。

本研究在玉米自交系 KWS49 中鉴定出一个自然突变产生的无花营型雄性不育突变体 *ms20s2*, 遗传分析表明其不育性状受单个隐性核基因调控。通过表型和细胞学观察, 明确 *ms20s2* 突变体与野生型在花营发育过程中的表型差异。利用图位克隆方法对不育性状调控基因进行克隆和初步的功能分析。研究结果不仅为深入解析玉米花营发育的分子调控机制奠定了理论基础, 也为玉米细胞核雄性不育系应用于杂交制种提供了新材料。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本研究所用玉米材料包括: 玉米自交系昌 7-2 (C7-2)、郑 58 (Z58)、KWS49 (野生型对照, WT), 玉米雄性不育突变体 *ms20s2*、*ms32-ref*。突变体 *ms20s2* 为玉米自交系 KWS49 的自然突变, 突变体

ms32-ref 来源于 MaizeGDB (www.maizegdb.org) 网站。本研究中使用的玉米材料种植于中国农业科学院作物科学研究所昌平试验基地和海南三亚试验基地并由试验基地进行常规育种管理。2020 年夏季, 课题组在昌平试验基地以玉米自交系郑 58 (Z58) 为父本, 雄性不育突变体 *ms20s2* 为母本杂交得到 F_1 , 同年冬季在海南试验基地将 F_1 自交获得 F_2 定位群体, 并于次年春季种于昌平试验基地。2021 年冬季, 课题组在海南试验基地以 *ms32-ref* 的杂合型 (+/ *ms32-ref*) 为父本, 突变体 *ms20s2* (*ms20s2* / *ms20s2*) 为母本进行杂交得到等位测验群体的种子, 于 2022 年夏季种于昌平试验基地得到等位测验的鉴定群体。

1.2 试验方法

1.2.1 农艺性状测量及花粉育性观察 分别测量 20 株突变体和野生型的株高、穗位高、雄穗主轴长和雄穗分支数, 整理数据并计算其平均值、标准差, 通过 T 检验进行差异分析。

玉米散粉期取多枚野生型和突变体花营分别置于载玻片上, 用镊子捣碎后, 移液器滴加 200 μ L 1.5% 的淀粉碘化钾溶液, 在体视显微镜 (奥林巴斯, SZX16) 下观察花粉染色情况并拍照。

1.2.2 花营扫描电镜及石蜡切片观察 扫描电镜样品选取与处理: 在 9 叶期和散粉期分别取雄性不育突变体和野生型的花营, 置于 FAA 固定液中保存。花营组织依次置于 50%、60%、70%、80%、90%、100% 的乙醇中进行脱水, 然后进行 CO_2 临界点干燥和喷金处理。最后使用场发射扫描电镜 (中科百测, 日立, S-4800) 观察突变体和野生型花营和花粉粒的形态并拍照。

石蜡切片材料选取: 玉米播种 45 d 后, 取长度为 1000 ~ 1200 μ m、1500 ~ 1700 μ m、1900 ~ 2200 μ m、2400 ~ 2700 μ m、2900 ~ 3200 μ m 和 3800 ~ 4200 μ m 的野生型及突变体花营, 取样后装入 2 ml 离心管中用 FAA 固定液保存。

石蜡切片样品处理: 将样品分别置于 50%、75%、85%、95% 的乙醇中, 分别在 4 $^{\circ}C$ 下脱水 1.5 h, 用无水乙醇在 4 $^{\circ}C$ 下脱水 2 h。然后将样品分别置于无水乙醇和透明剂 histoclear 比例为 3/1、1/1 和 1/3 混合液中, 室温下浸泡 1.5 h, 再用纯的 histoclear 浸泡两次, 每次 2 h。浸泡结束后吸出一半的环保透明液, 在样品中加入熔化的固体石蜡于 60 $^{\circ}C$ 的恒温箱中放置 12 h, 之后每 12 h 更换一次石蜡, 共更换 5 次。

切片及观察:用石蜡将样品包埋,使用石蜡切片机(徕卡, RM2265)对包埋样品进行切片,厚度 8 μm , 展片后在 42 $^{\circ}\text{C}$ 的干燥台上干燥。彻底干燥后再将样品脱蜡和复水,用 ddH₂O 浸泡 1 min 后,用 0.5% 甲苯胺蓝溶液染色 5 min,之后分别用 50% 乙醇和无水乙醇浸泡 2 min,待乙醇晾干后使用正置荧光显微镜(奥林巴斯, BX53)观察并拍照。

1.2.3 DNA 提取及目的基因的定位 在 F₂ 分离群体中选取 60 株雄性不育突变体以及 2 个亲本的叶片利用 CTAB 法提取 DNA,使用中玉金标记(北京)生物技术股份有限公司开发的玉米 10K SNP 芯片开展样品的基因型检测。通过分析不育性状与 SNP 标记间的连锁关系获得目的基因所在的染色体区段。在初定位区间内设计新的 InDel 标记,扩大定位群体,完成基因的精细定位。利用 Gramene (<https://www.gramene.org/>) 网站分析定位区间内的蛋白编码基因并测序分析基因序列^[36],最终找到候选基因及其突变位点。候选基因测序引物为 *ms20s2*-F、R, 突变位点扩增引物为 *ms20s2*-insert-F、R, 其引物序列见表 1。

表 1 *ms20s2* 克隆及荧光定量所用引物

Table 1 Primers for *ms20s2* cloning and RT-qPCR

引物名称 Primers name	引物序列(5'-3') Primers sequence(5'-3')	用途 Purpose
<i>ms20s2</i> -F	TGTCATCAGTCCACAGCCAG	克隆
<i>ms20s2</i> -R	GCACAAACACTCCACCGCT	
<i>ms20s2</i> -insert-F	AGCAGTCCACGAGACAGG	
<i>ms20s2</i> -insert-R	TGCTTGGGACCTCCACGA	
ID1079-F	ATCATACTGCTTGGCACGGTGG	
ID1079-R	CGTTTTTTTTTCTCCGATGCC	
ID1086-F	AATTGAGGCACGAAATGACATG	
ID1086-R	AATCCGATATTCCAGGCTTCA	
ID1146-F	TTGGTGATGTGTCTCTGTCTG	
ID1146-R	CCTGCCACGCCCTCAAT	
ID1147-F	TAGGTAGTTGCGGCGGTCT	
ID1147-R	TAAGAATCCTCTGCGATCAAGAA	
<i>MS32</i> -qPCR-F	GAGTGAGTCAGTGAGGCTGGGAT	qRT-PCR
<i>MS32</i> -qPCR-R	TTGAGCACCGAGTCGACGAAG	
<i>Tubulin</i> -F	GTGTCCTGTCCACCCACTCTCT	
<i>Tubulin</i> -R	GGAACCTGTTTCACATCAACGTTC	

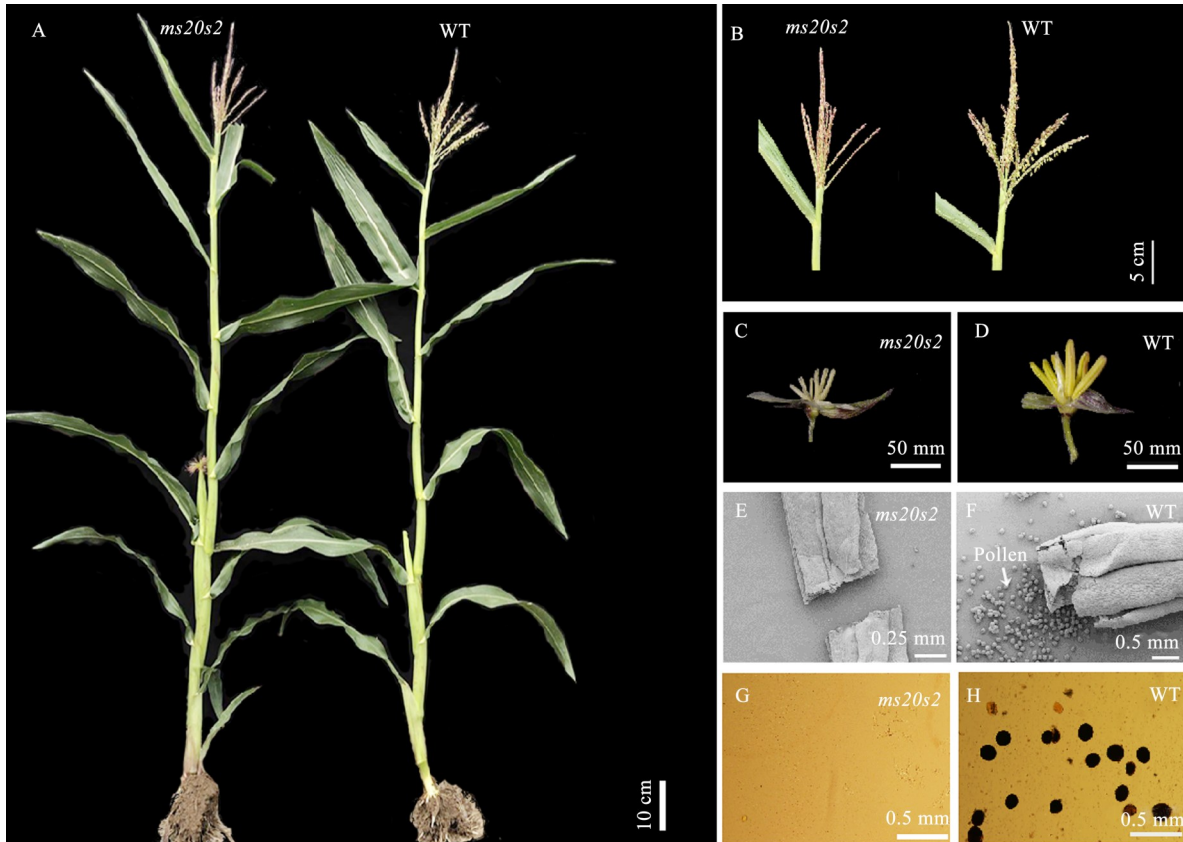
1.2.4 RNA 提取及 RT-qPCR 分析 以玉米自交系昌 7-2 为材料,分别取苗期的根和叶,拔节期的根、茎和叶,散粉期的茎、叶、雌穗、叶耳以及不同发育时期的花药组织,液氮冷冻后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,用于基因的组织表达分析。不同时期的花药取样方法为,选取玉米雄穗中部小花,剥离颖壳后在上位花中依次取长度为 800 ~ 1200 μm 、1200 ~ 1600 μm 、1600 ~ 2000 μm 、2000 ~ 2500 μm 、2500 ~ 3000 μm 和 3000 ~ 3500 μm 的花药作为样品。每个发育时期取 3 份不同植株的花药组织混样,并设置 2 组生物学重复。使用植物总 RNA 提取试剂盒(诺唯赞, DP432)提取样品 RNA,所有器具、耗材、试剂在使用前已做 RNase free 处理,实验步骤均参照试剂盒说明书。提取完成后通过琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,使用分光光度计测定 RNA 样品浓度。

使用 cDNA 逆转录试剂盒(诺唯赞, R312)进行 cDNA 合成,反应体系及实验步骤参照说明书。实时荧光定量使用 qPCR 试剂盒(诺唯赞, Q712),反应体系参考说明书,选择玉米 *Tubulin* 作为内参。反应程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 运行 45 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 运行 10 sec; 60 $^{\circ}\text{C}$ 运行 10 sec; 40 个循环。荧光定量使用引物为 *MS32*-qPCR-F、R 和 *Tubulin*-F、R, 其引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 雄性不育突变体 *ms20s2* 表型分析

表型观察和性状测量结果发现,突变体在株高和穗位高等农艺性状上与野生型没有显著差异(图 1A, 表 2)。在雄穗性状上,突变体的雄穗分支数与野生型没有显著差异,而雄穗主轴长度变短,且能观察到雄花干瘪,发育不良的表型。此外,突变体雄花的花药细小、长度较短、颜色偏淡,而野生型花药则更长、更饱满、颜色金黄(图 1B~D)。将成熟花药破开后,在野生型花药中观察到大量花粉粒,而在突变体花药中则未观察到花粉粒(图 1E, F)。花粉活力检测发现野生型花粉可被淀粉碘化钾溶液完全染成蓝黑色,表明花粉具备良好的活力(图 1G, H)。以上结果说明 *ms20s2* 突变体属于无花粉型雄性不育。



A: 散粉期植株; B: 雄穗; C, D: 小花; E, F: 断裂花药; G, H: 花粉 I₂-KI 染色; WT: 野生型, 下同
 A: Plants at the anthesis stage; B: Tassels; C, D: Spikelet; E, F: Broken anthers; G, H: I₂-KI staining of pollen grains;
 WT: Wild type, the same as below

图 1 突变体 *ms20s2* 与野生型植株的表型分析

Fig. 1 Phenotypic analysis of *ms20s2* mutant and wild type plants

表 2 突变体 *ms20s2* 与野生型植株的性状比较

Table 2 Comparison of plant traits between *ms20s2* mutant and wild-type

性状类型 Trait type	株高(cm) Plant height	穗位高(cm) Ear height	雄穗主轴长(cm) Total tassel length	雄穗分支数 Tassel branch number
野生型 WT	156.93±8.42	39.67±10.03	25.04±2.66	17.67±2.15
突变体 <i>ms20s2</i> Mutant <i>ms20s2</i>	149.20±11.69	40.40±6.81	22.32±3.31	16.20±3.79
P 值 P value	0.078	0.848	0.04*	0.25

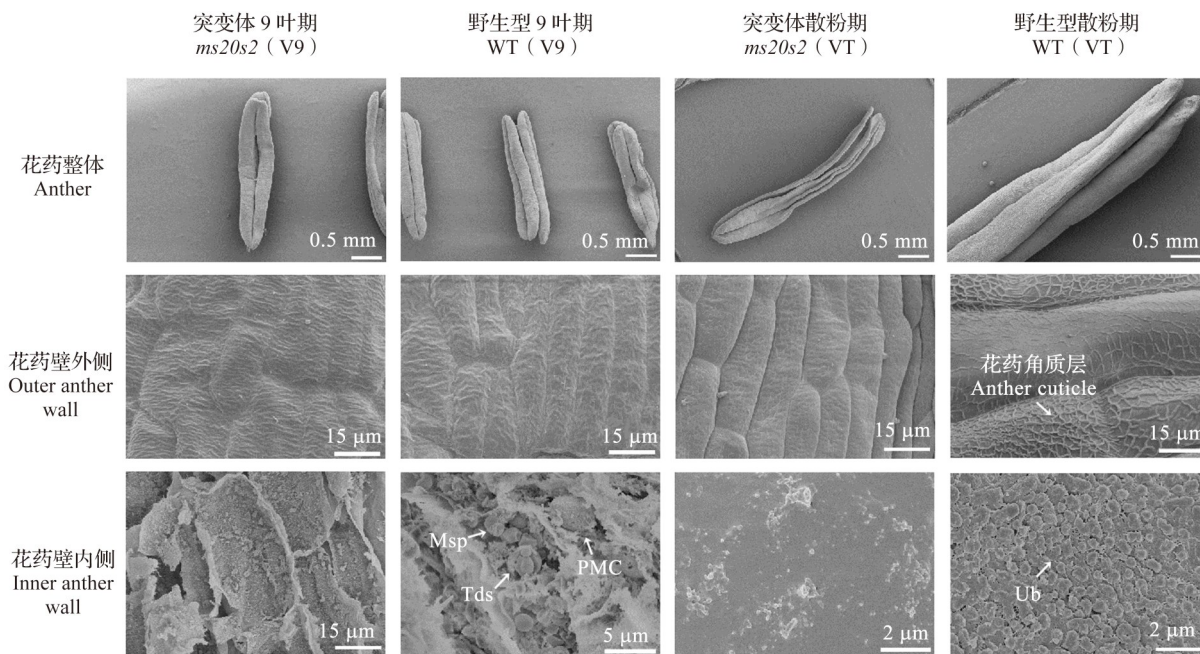
*表示在 $P < 0.05$ 水平上显著差异

* indicates significant difference at $P < 0.05$ level

2.2 花药的扫描电镜观察分析

分别取突变体 *ms20s2* 和野生型植株在 9 叶期及抽雄期时期的花药, 通过扫描电镜详细观察花药内壁和外壁的结构特征(图 2)。结果显示, 在 9 叶期, 突变体和野生型花药大小及花药外部的微观结构并无明显差异, 且在野生型花药内部能够观察到正在进行减数分裂的孢母细胞以及减数分裂完成后的小孢子, 而在突变体花药内部则未观察到生殖细胞。抽穗期之后, 突变体和野生型花药在长度和大小上有较大差距, 突变体花药的药室明显空瘪皱缩, 而野生型花药十分饱满。此外, 突变体和野生型的花药的

内壁和外壁表型也存在较大差异, 在野生型花药壁外部能够明显观察到条纹状的角质层结构, 而突变体花药角质层结构则不明显; 在野生型花药药室内壁能观察到密集且规则的乌式体结构, 而突变体花药药室内壁仅能观察到少许斑纹, 未观察到明显的乌式体结构(图 2)。以上结果表明, 突变体花药内的花粉母细胞在开始减数分裂之前便已经死亡, 导致花药发育成熟后突变体药室内没有产生花粉粒; 成熟后的突变体花药其花药外壁未形成正常的角质层结构, 花药壁内部也未形成明显的乌式体结构, 这表明突变体花药壁的发育也存在异常。



V9: 9叶期; VT: 散粉期; Msp: 小孢子; PMC: 花粉母细胞; Tds: 减数分裂四分体; Ub: 乌式体; 下同
 V9: Vegetative stage 9; VT: Vegetative tasseling stage; Msp: Microspore; PMC: Pollen mother cell;
 Tds: Meiosis tetrads; Ub: Ubisch body; The same as below

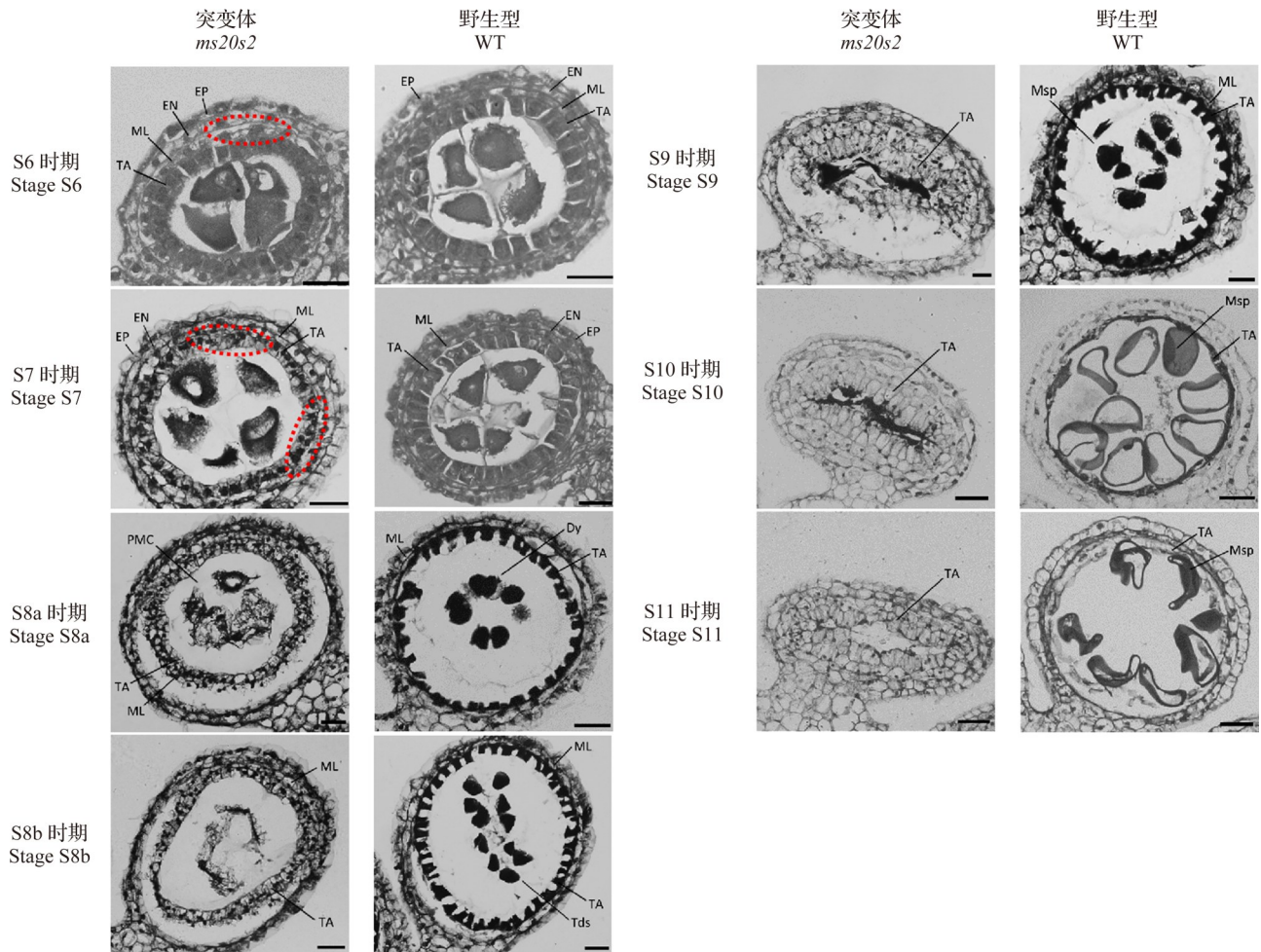
图2 突变体 *ms20s2* 与野生型花药扫描电镜观察

Fig. 2 Observation of the *ms20s2* mutant and wild-type anthers by scanning electron microscope

2.3 花药石蜡切片分析

为进一步研究突变体 *ms20s2* 与野生型花药在细胞表型上的差异,对不同发育阶段的突变体及野生型花药进行石蜡切片观察(图3)。结果显示,突变体花药伸长至 3000 μm 左右时,其伸长状态相较于野生型开始出现显著差异。如图3所示,当突变体和野生型花药伸长至约 1200 μm 时,花药处于绒毡层初步形成的S6时期,此时已经能够观察到突变体 *ms20s2* 和野生型花药形态间的差异。S6时期的野生型的花药形成花药外壁、花药内皮、中间层、绒毡层四层花药壁细胞结构,而在突变体花药中却观察到个别中间层细胞发生多余的径向分裂。在花药伸长至 1600 μm 时,花药发育处于S7时期,此时突变体和野生型花药中的孢原细胞已完成发育形成花粉母细胞,花药壁正在进行周向生长,而在突变体中能观察到部分绒毡层细胞存在异常分裂。在花药伸长至 2000 ~ 2500 μm 时,花药发育进入S8时期,此时野生型花药绒毡层已经液泡化,花粉母细胞开启减数分裂的过程,能够清晰地观察到处于二分体以及四分体时期的细胞;而在突变体花药中观察到绒毡层正在发生萎缩,药室中的花粉母细胞开始死亡,中间层

部分解体成游离的细胞,部分粘连在绒毡层和花药内皮上。在花药发育至 2500 ~ 3000 μm 时,花药发育进入S9时期,此时野生型小孢子细胞已经形成,而突变体花药整个绒毡层已完全萎缩,花粉母细胞全部死亡。此后,突变体花药伸长速度放缓,整个花药壁都发生萎缩,而野生型花药则能够继续伸长,药室内的小孢子细胞也能够正常发育。在野生型花药伸长至 3500 ~ 4000 μm 时,花药发育到S10 ~ S11时期,此时小孢子细胞在完成液泡化后体积膨大,并进一步伸长至纺锤状(图3)。上述结果表明,从花药发育的S6时期开始, *ms20s2* 突变体花药的中间层细胞部分发生异常分裂,从而导致在周向生长的过程中花药壁结构异常,引起花药壁的萎缩。花药绒毡层被认为在花药发育和花粉形成过程中参与相关功能和营养物质的合成,而中间层细胞则参与绒毡层细胞和其他组织之间的物质转运,绒毡层细胞的代谢异常可能会导致花药外壁和花粉粒的发育异常,在 *ms20s2* 突变体中由中间层和绒毡层细胞异常分裂引起的花药壁的发育异常,导致了花粉母细胞未进入减数分裂便已经死亡,该结果也与扫描电镜的结果相一致。



EP: 花药外壁; EN: 花药内皮; ML: 中间层; TA: 绒毡层; Dy: 减数分裂二分体。S6 ~ S9 时期的石蜡切片图中标尺长度为 20 μm , S10、S11 时期的石蜡切片图中标尺长度为 50 μm 。红圈标识部分为突变体 *ms20s2* 花药中间层和绒毡层细胞异常分裂区域

EP: Epidermis; EN: Endothecium; ML: Middle layer; TA: Tapetum; Dy: Meiosis dyad. The bars are 20 μm in pictures from S6 to S9, and 50 μm from S10 to S11. The red circle indicates the region of abnormal cell division in the middle layer and tapetum in *ms20s2* mutant

图 3 突变体 *ms20s2* 与野生型不同发育时期花药横切片观察

Fig. 3 Transverse section analyses of anthers in *ms20s2* mutant and wild type at different developmental stages

2.4 遗传分析

对突变体 *ms20s2* 与自交系郑 58 杂交后得到的 F_1 与 F_2 定位群体中玉米植株的育性进行调查发现, F_1 群体的所有植株均能正常授粉结实, 其花药表型与野生型没有差异; 而 F_2 群体中发生可育植株与雄性不育植株的分离。统计 F_2 群体中的可育植株与雄性不育植株的分离情况发现, 在 2288 株的 F_2 定位群体中, 1687 株表现为雄性可育, 601 株表现为雄性不育, 卡方检验得到卡方值为 1.89, F_2 定位群体中可育与不育植株的分离符合 3:1 的遗传分离比(表 3)。表明 *ms20s2* 雄性不育突变体的不育性状受单个隐性核基因控制。

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

组合 Cross	野生型株数 Number of wild type plants	突变体株数 Number of mutant plants	$\chi^2_{(3:1)}$
<i>ms20s2</i> \times Z58	1687	601	1.89

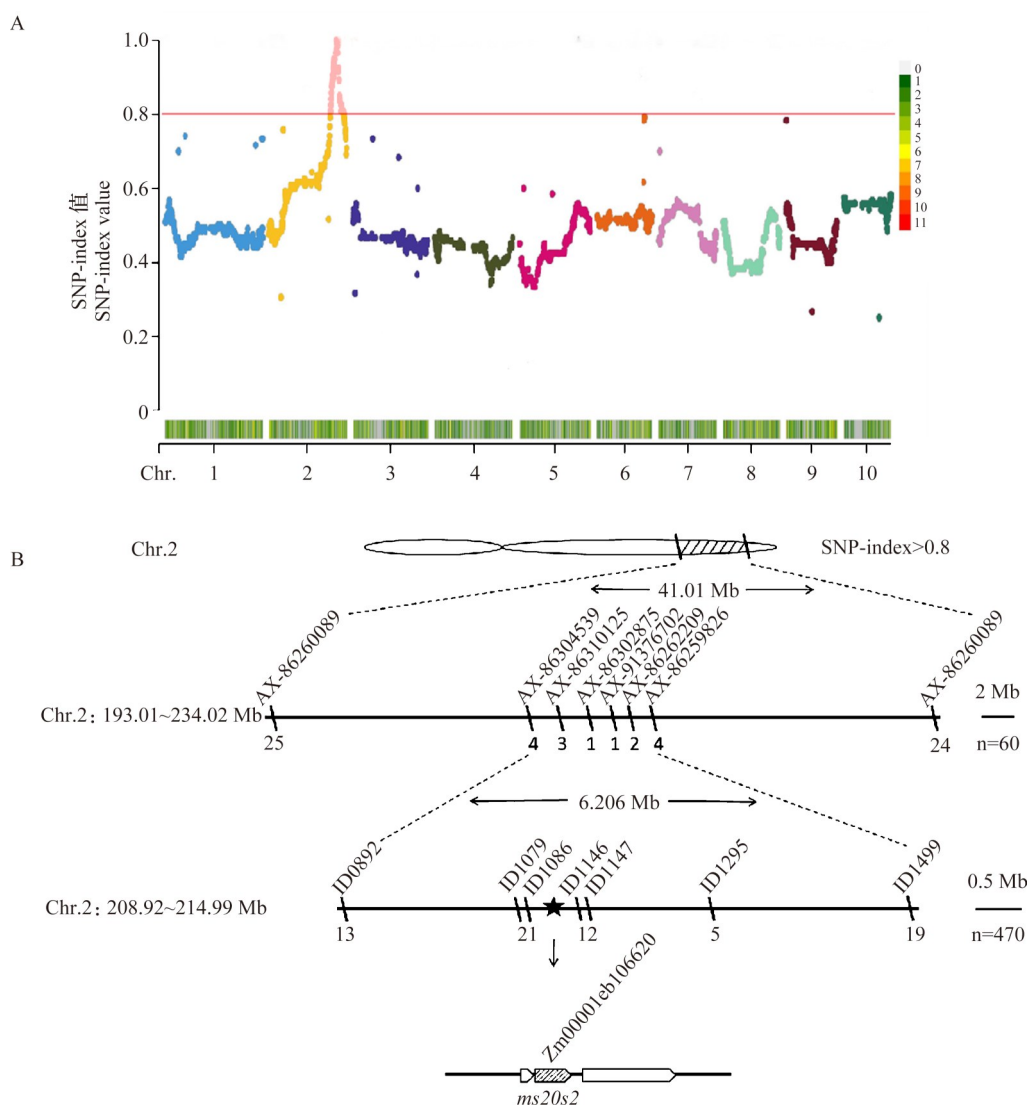
$$\chi^2_{0.05} = 3.84$$

2.5 目的基因的定位

在 F_2 定位群体中选取 60 株雄性不育单株及其双亲叶片提取基因组 DNA, 利用 10K SNP 芯片对雄性不育基因 *ms20s2* 进行初步定位。通过计算全基

基因组 3634 个双亲间多态性 SNP 标记的 SNP-index 值,发现不育性状与 2 号染色体上的 SNP 标记存在连锁关系(图 4A)。其中 2 号染色体长臂上 193.01 ~ 234.02 Mb 区段内 99 个 SNP 标记的 SNP-index 值都大于 0.8,在对这 99 个 SNP 标记进行分析后,初步将 *ms20s2* 定位在 2 号染色体上 208.92 ~ 214.99 Mb 区段内(图 4)。根据双亲在基因组序列上的差异,在初定位区段内开发新的 Indel 标记,对 *ms20s2* 进行精细定位。当 F_2 群体不育单株的数量扩大至 470 后,进一步将 *ms20s2* 定位在 ID1086 和 ID1146 两个标记之间,约为 590 kb 的区段内。通过分析已

发表的花药转录组数据^[36],发现区段内存在 1 个花药特异性表达的基因 *Zm00001eb106620*。对该基因进行测序分析发现,基因全长 2084 bp,编码区 CDS 663 bp,编码 1 个由 220 个氨基酸残基构成的 bHLH 家族转录因子(测序材料为 C7-2, KWS49)。对 *Zm00001eb106620* 基因全长扩增测序后发现,突变体 *ms20s2* 在该基因的第 4 个外显子第 31 个碱基处插入了一段 3166 bp 的未知序列(图 5)。此外,定位区间还有另外两个基因,其中 *Zm00001eb106610* 编码未知功能蛋白, *Zm00001eb106630* 编码 1 个质子泵蛋白 VPP10。

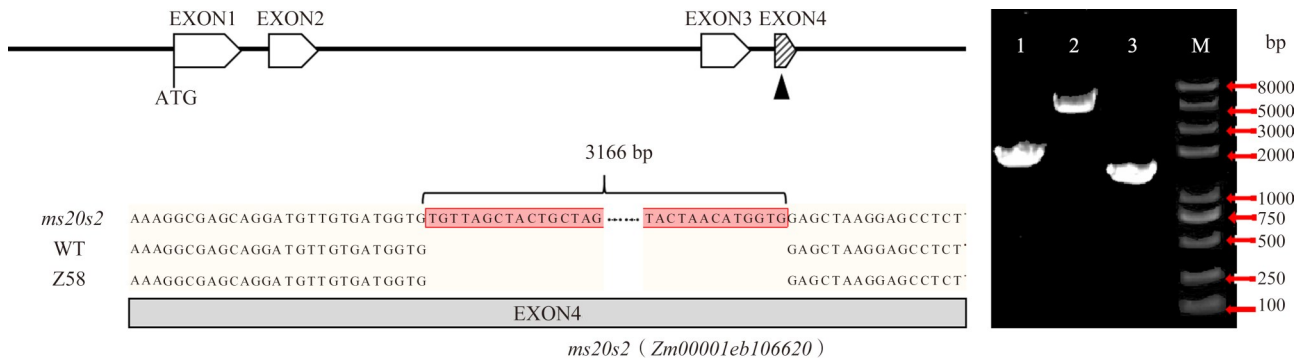


A: SNP-index 全基因组频率分布图; B: *ms20s2* 突变位点的精细定位; n: F_2 群体大小

A: Genome-wide distribution of SNP-index; B: The fine mapping of *ms20s2* mutant; n: F_2 recessive population used in mapping

图 4 *ms20s2* 的精细定位

Fig. 4 Fine mapping of *ms20s2* mutant



左图为 *MS32* 基因结构及 *ms20s2* 突变位点; 右图为野生型、突变体 *ms20s2*、郑 58 三种材料中 *Zm00001eb106620* 基因全长扩增片段的琼脂糖凝胶电泳图; 1: KWS49; 2: 突变体 *ms20s2*; 3: 郑 58; M: *Trans 2K plusII* DNA Ladder

The left figure is the gene structure of *MS32* and mutation site in *ms20s2*; The right figure shows the results of agarose gel electrophoresis analysis of the full-length gene of and *Zm00001eb106620* in WT, *ms20s2* mutant and Z58. 1: KWS49; 2: *ms20s2*;

3: Z58; M: *Trans 2K plusII* DNA Ladder

图 5 *MS32* 的基因结构示意图和 *ms20s2* 的突变位点

Fig. 5 Structure schematic diagram of *MS32* gene and the mutation site of the *ms20s2* mutant

2.6 *ms20s2* 突变体等位测验与鉴定标记开发

研究发现 *Zm00001eb106620* 是一个已知的雄性不育基因 *MS32*^[19], 通过 MaizeGDB 获取了该基因的雄性不育突变体 *ms32-ref* 的杂合野生型种子 (+ / *ms32-ref*)。为验证 *ms20s2* 是否是 *MS32* 的新等位基因, 以 *ms32-ref* 的杂合型 (+ / *ms32-ref*) 为父本, 突变体 *ms20s2* (*ms20s2* / *ms20s2*) 为母本进行杂交, 获得 *ms20s2* 与 *ms32-ref* 的等位测验群体, 并对群体的育性进行了调查。结果显示, 等位测验群体中发生了雄性不育植株与可育株的分离, 不育株的雄花花药发育不良且未能够形成花粉, 其不育表型与突变体 *ms20s2* 一致 (图 6)。对群体中雄性不育株和可育株进行统计发现, 不育株共有 152 株, 可育株共有 146 株, 可育植株与不育植株的分离符合 1:1 的遗传分离比 ($\chi^2 = 0.73$, $\chi^2_{0.05} = 3.84$)。该结果证实 *ms20s2* 为雄性不育基因 *MS32* 的一个新等位突变。

根据 *ms20s2* 突变体在 *MS32* 基因上的大片段插入, 设计了一个 InDel 标记引物 (*ms20s2-insert-F*, *R*, 引物序列见表 1) 用以鉴定野生型和突变体的基因型。该标记能够区分出 F_2 群体中的野生型 (+ / +)、突变体 (*ms20s2* / *ms20s2*) 和杂合体 (+ / *ms20s2*) 的基因型, 检测结果与其表型特征一致 (图 7)。

2.7 表达模式分析

突变体 *ms20s2* 与野生型主要在花药表型上存在差异, 而在株高和穗位等性状上无显著差异, 因此推测该基因可能在花药中特异表达。通过荧光定量分析 *MS32* 基因在野生型苗期植株的根和叶, 拔节期 (播种后第 6 周, 9 叶期) 植株的根、茎和叶, 散

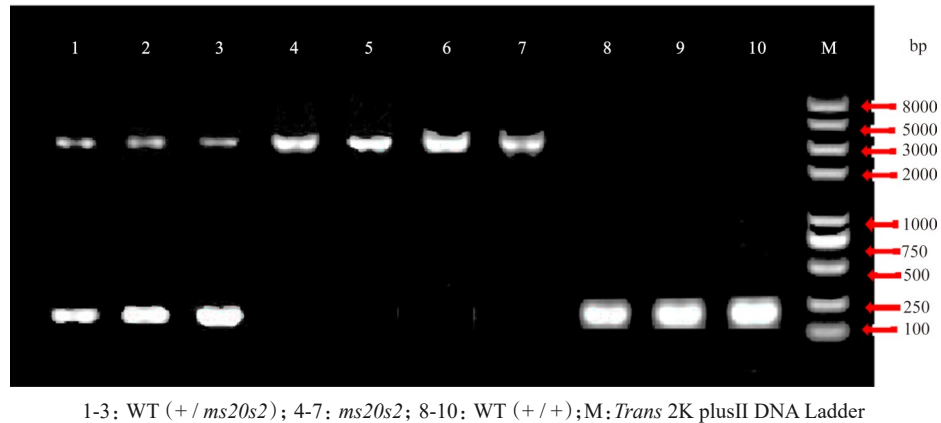


A: 雄穗; B, C: 小花; D, E: 花粉 I₂-KI 染色

A: Tassels; B, C: Spikelet; D, E: I₂-KI staining of pollen grains

图 6 等位测验群体可育与不育植株雄花表型分析

Fig. 6 Phenotype analysis of the spikelet from sterile and fertile plants in the allelism test population



1-3: WT (+/ *ms20s2*); 4-7: *ms20s2*; 8-10: WT (+/+); M: *Trans 2K plusII* DNA Ladder

图7 新功能标记在 F_2 定位群体中的鉴定

Fig. 7 Genotype identification of plants in the F_2 mapping population using new-designed functional marker

粉期(播种后第12周)植株的茎、叶、雌穗,以及不同发育时期的花药(800 μm 、200 μm 、1600 μm 、2000 μm 、2500 μm 、3000 μm 、4000 μm)中的表达情况。结果显示,除了花药以外,*MS32*在其他组织中几乎不表达,且*MS32*基因仅在花药发育到长度约为1200~1600 μm 的时期表达水平显著升高(图8)。该时期花药处于S6到S7的发育时期,此阶段花药绒毡层已经分化完成,孢原细胞分化为花粉母细胞并开始进行减数分裂前的准备。结合花药石蜡切片观察结果可知,*MS32*基因在花药发育的S6、S7时期起重要调控作用,突变后可能引起中间层和绒毡层细胞的异常分裂,进而导致花药壁结构发育异常,使得花粉母细胞无法进行减数分裂并死亡。

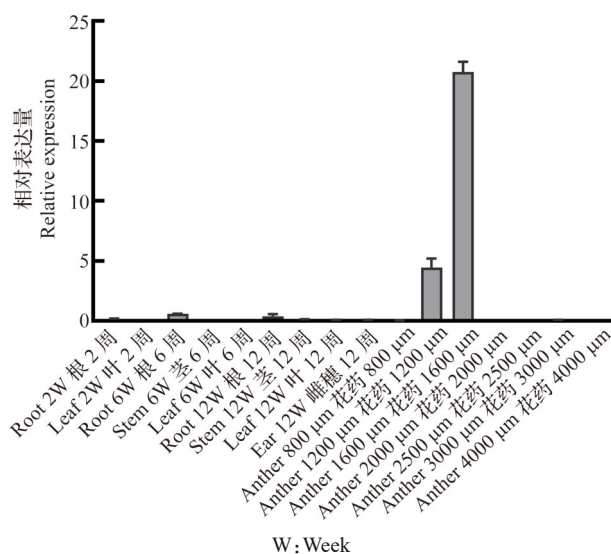


图8 *MS32*组织特异性表达分析

Fig. 8 The relative expression level of *MS32* gene in different tissues

3 讨论

本研究发现的*ms20s2*属于无花粉型雄性不育突变体,突变体花药细小,颜色较浅。扫描电镜结果显示,*ms20s2*突变体花药中没有观察到正在减数分裂的花粉母细胞,且成熟花药的花药壁外部角质层形成异常,花药壁内部未观察到乌式体结构。对不同发育阶段花药的石蜡切片观察结果表明,*ms20s2*突变体花药在发育到S6时期后部分中间层和绒毡层细胞发生异常分裂,产生了多余的细胞层,破坏了花药壁的正常结构,从而引起花药壁萎缩,花粉母细胞无法进行减数分裂并死亡。基因定位和等位测验结果表明*ms20s2*是细胞核雄性不育基因*MS32*的等位突变体。

2012年Moon等^[19]利用玉米雄性不育突变体*ms32-ref*和*ms32-6066*首次克隆雄性不育基因*MS32*。其中突变体*ms32-6066*的1号内含子上有1个ruq-转座子的插入,导致*MS32*编码序列中环结构区域上的第81个氨基酸密码子后额外插入了两个密码子(缬氨酸和谷氨酰胺);突变体*ms32-ref*在*MS32*上有1个大于1.6 kb的缺失,导致3和4号外显子丢失。尽管1、2号外显子能够正常表达,但突变后的*ms32*丧失了基因功能。对突变体*ms32-ref*花药的半薄切片分析显示,在花药壁4个细胞层分化完成后,花粉母细胞减数分裂开始前,部分中间层和绒毡层先后都异常分裂出额外的细胞层,少数花药内皮细胞也发现了异常的径向分裂,这种异常分裂随着花药壁细胞层的发育而增多,最终多层绒毡层细胞伸长和液泡化,压碎了药室内的花粉母细胞,这与突变体*ms32-6066*在2000年被首次报道时发现的情况类似。荧光定量实验表明*MS32*在减数

分裂前的花药中表达,原位杂交实验表明^[19],*MS32*首先在L2中表达,随着花药的发育最后只在绒毡层中表达。不同于这两种突变体,*ms20s2*虽然存在花药中间层和绒毡层细胞的异常分裂,却并未发现绒毡层细胞将花粉母细胞压碎,而是观察到花粉母细胞死亡的同时花药绒毡层也在萎缩的现象。*ms20s2*、*ms32-600*和*ms32-ref*这3种突变体中均未发现进入减数分裂阶段的花粉母细胞,说明*MS32*在调控中间层和绒毡层细胞的分裂外,还有可能参与对花粉母细胞减数分裂过程的调控。此外,在花药发育的过程中,花药外的营养物质以及花药内皮层细胞在光合作用下合成的淀粉需要通过中间层输送到绒毡层;绒毡层合成的物质又需要通过中间层、花药内皮层运输到花药外壁上。此前,万向元团队发现*ZmMS33*突变导致花药中间层次生壁加厚,引起了花药代谢混乱,花药组织中糖类、脂质含量显著下调,最终造成花药停止发育以及小孢子的死亡^[23-25]。因此,*MS32*基因突变引起的中间层和绒毡层细胞的异常分裂也有可能破坏花药正常的代谢网络,从而导致花药发育停滞。

*MS32*基因编码的BHLH家族转录因子是植物中第二大类的转录因子家族。BHLH转录因子在玉米花药发育和雄性育性形成中具有重要作用。Nan等^[17-18]对4个玉米雄性育性调控转录因子*MS23*、*MS32*、*BHLH51*和*BHLH122*的研究表明,*MS32*与*MS23*以及*BHLH122*,*MS23*与*BHLH51*,*BHLH122*与*BHLH51*,以及*BHLH51*自身之间都能够互相作用,在花药发育的不同时期中级联表达调控绒毡层细胞分化和花粉母细胞减数分裂。这4个转录因子表达顺序先后为*MS23*、*MS32*、*BHLH122*和*BHLH51*。

本研究中*MS32*的新等位突变体*ms20s2*花药发育异常,雄性育性彻底丧失,但并未对玉米其他农艺性状造成显著影响,因此*ms20s2*具有应用于玉米雄性不育杂交制种的潜在价值。利用突变体*ms20s2*中大片段插入所设计的InDel功能标记能够有效地鉴定突变体和野生型的基因型,为该突变位点向优异母本材料的回交导入提供了辅助选择标记。随着分子生物学的发展,利用SPT(Seed production technology)技术或基因编辑技术可以构建*ms20s2*核不育保持系,从而实现不育系的保持和繁殖。

4 结论

本研究在玉米自交系KWS49中分离出一种无花粉型雄性不育突变体材料*ms20s2*。该突变体花

药在发育的S6时期部分中间层和绒毡层细胞发生异常分裂,破坏了花药壁的正常结构,最终导致花药壁萎缩,且花粉母细胞无法进行减数分裂并死亡。基因定位结果表明*ms20s2*是*MS32*基因的一个新等位突变体。*MS32*基因在小孢子母细胞形成和减数分裂起始阶段特异表达。在*ms20s2*突变体中,*MS32*基因的第4外显子的大片段插入可能引起了蛋白功能的改变,进而造成植株的雄性不育。综上所述,本研究中的*ms20s2*突变位点为隐性核不育系的创制提供了新的等位基因和材料资源,开发的InDel功能标记为该位点在玉米杂交制种中的应用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Wang Y B, Bao J X, Wei X, Wu S W, Fang C W, Li Z W, Qi Y C, Gao Y X, Dong Z Y, Wan X Y. Genetic structure and molecular mechanisms underlying the formation of tassel, anther and pollen in the male inflorescence of Maize (*Zea mays* L.). *Cells*, 2022, 11(11):1753
- [2] 时子文, 何青, 赵卓凡, 刘孝伟, 张鹏, 曹墨菊. 玉米雄性不育资源的发掘与利用. *遗传*, 2022, 44(2):134-152
Shi Z W, He Q, Zhao Z F, Liu X W, Zhang P, Cao M J. Discovery and utilization of male sterile resources in maize. *Hereditas* (Beijing), 2022, 44(2):134-152
- [3] Goldberg R B, Beals T P, Sanders P M. Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell*, 1993, 5(10):1217-1229
- [4] Ma H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56:393-434
- [5] Zhang D, Luo X, Zhu L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38(9):379-390
- [6] Jiang Y L, An X L, Li Z W, Yan T W, Zhu T T, Xie K, Liu S S, Hou Q C, Zhao L N, Wu S W, Liu X Z, Zhang S W, He W, Li F, Li J P, Wan X Y. CRISPR/Cas9-based discovery of maize transcription factors regulating male sterility and their functional conservation in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(9):1769-1784
- [7] Zhou L Z, Juranić M, Dresselhaus T. Germline development and fertilization mechanisms in maize. *Molecular Plant*, 2017, 10(3):389-401
- [8] Walbot V, Egger R L. Pre-meiotic anther development: Cell fate specification and differentiation. *Annual Review of Plant Biology*, 2016, 67:365-395
- [9] Begcy K, Dresselhaus T. Tracking maize pollen development by the leaf collar method. *Plant Reproduction*, 2017, 30(4):171-178
- [10] Van Der Linde K, Walbot V. Pre-meiotic anther development.

- Current Topics in Developmental Biology, 2019, 131:239-256
- [11] Ariizumi T, Toriyama K. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Current Topics in Developmental Biology*, 2011, 62:437-460
- [12] 周雨露, 林泓, 张大兵, 王灿华, 余婧. 酮类物质合成酶 OsPKS1 和 OsPKS2 对水稻花粉外壁形成的作用. *中国农业科学*, 2019, 52(8): 1295-1307
- Zhou Y L, Lin H, Zhang D B, Wang C H, Yu J. The function of the polyketide synthase OsPKS1 and OsPKS2 in regulating pollen wall formation in rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(8):1295-1307
- [13] Chaubal R, Anderson J R, Trimmell M R, Fox T W, Albertsen M C, Bedinger P. The transformation of anthers in the *mscal* mutant of maize. *Planta*, 2003, 216(5):778-788
- [14] Kelliher T, Walbot V. Hypoxia triggers meiotic fate acquisition in maize. *Science*, 2012, 337(6092):345-348
- [15] Wang C J, Nan G L, Kelliher T, Timofejeva L, Vernoud V, Golubovskaya I N, Harper L, Egger R, Walbot V, Cande W Z. Maize multiple archesporial cells 1 (*mac1*), an ortholog of rice TDL1A, modulates cell proliferation and identity in early anther development. *Development*, 2012, 139(14):2594-2603
- [16] Liu X Z, Zhang S W, Jiang Y L, Yan T W, Fang C W, Hou Q C, Wu S W, Xie K, An X L, Wan X Y. Use of CRISPR/Cas9-based gene editing to simultaneously mutate multiple homologous genes required for pollen development and male fertility in maize. *Cells*, 2022, 11(3):439
- [17] Nan G L, Teng C, Fernandes J, O'connor L, Meyers B C, Walbot V. A cascade of bHLH-regulated pathways programs maize anther development. *Plant Cell*, 2022, 34(4):1207-1225
- [18] Nan G L, Zhai J, Arikait S, Morrow D, Fernandes J, Mai L, Nguyen N, Meyers B C, Walbot V. MS23, a master basic helix-loop-helix factor, regulates the specification and development of the tapetum in maize. *Development*, 2017, 144(1):163-172
- [19] Moon J, Skibbe D, Timofejeva L, Wang C J, 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 Journal*, 2013, 76(4):592-602
- [20] Albertsen M C, Fox T, Leonard A, Bailin L I, Loveland B, Trimmell M. Clone and use of the *MS9* gene from Maize. Johnston IA US, Wilmington DE US: Pioneer Hi-Bred International, Inc., E. I. Du Pont DE Nemours and Company, US-20180258445-A1, 2018
- [21] Shi J X, Cui M H, Yang L, Kim Y J, Zhang D B. Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(11):741-753
- [22] Zhang D B, Shi J X, Yang X J. Role of lipid metabolism in plant pollen exine development. *Sub-cellular Biochemistry*, 2016, 86:315-337
- [23] Xie K, Wu S W, Li Z W, Zhou Y, Zhang D F, Dong Z Y, An X L, Zhu T T, Zhang S M, Liu S S, Li J P, Wan X Y. Map-based cloning and characterization of *Zea mays* male sterility33 (*ZmMs33*) gene, encoding a glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(6):1363-1378
- [24] Zhu T T, Wu S W, Zhang D F, Li Z W, Xie K, An X L, Ma B, Hou Q C, Dong Z Y, Tian Y H, Li J P, Wan X Y. Genome-wide analysis of maize GPAT gene family and cytological characterization and breeding application of *ZmMs33/ZmGPAT6* gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 2019, 132(7):2137-2154
- [25] Li Z W, Liu S S, Zhu T T, An X L, Wei X, Zhang J, Wu S W, Dong Z Y, Long Y, Wan X Y. The loss-function of the male sterile gene *ZmMs33/ZmGPAT6* results in severely oxidative stress and metabolic disorder in maize anthers. *Cells*, 2022, 11(15):2318
- [26] Suzuki T, Narciso J O, Zeng W, Van De Meene A, Yasutomi M, Takemura S, Lampugnani E R, Doblin M S, Bacic A, Ishiguro S. KNS4/UPEX1: A type II arabinogalactan β -(1,3)-galactosyltransferase required for pollen exine development. *Plant Physiology*, 2017, 173(1):183-205
- [27] Tian Y H, Xiao S L, Liu J, Somaratne Y, Zhang H, Wang M M, Zhang H R, Zhao L, Chen H B. MALE STERILE6021 (MS6021) is required for the development of anther cuticle and pollen exine in maize. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1673-1676
- [28] Somaratne Y, Tian Y H, Zhang H, Wang M M, Huo Y Q, Cao F G, Zhao L, Chen H B. ABNORMAL POLLEN VACUOLATION1 (APV1) is required for male fertility by contributing to anther cuticle and pollen exine formation in maize. *Plant Journal*, 2017, 90(1):96-110
- [29] An X L, Dong Z Y, Tian Y H, Xie K, Wu S W, Zhu T T, Zhang D F, Zhou Y, Niu C F, Ma B, Hou Q C, Bao J X, Zhang S M, Li Z W, Wang Y B, Yan T W, Sun X J, Zhang Y W, Li J P, Wan X Y. *ZmMs30* encoding a novel GDGL lipase is essential for male fertility and valuable for hybridbreeding in maize. *Molecular Plant*, 2019, 12(3):343-359
- [30] Fox T, Debruijn J, Haug Collet K, Trimmell M, Clapp J, Leonard A, Li B, Scolaro E, Collinson S, Glassman K, Miller M, Schussler J, Dolan D, Liu L, Gho C, Albertsen M, Loussaert D, Shen B. A single point mutation in *Ms44* results in dominant male sterility and improves nitrogen use efficiency in maize. *Plant Biotechnol Journal*, 2017, 15(8):942-952
- [31] Jiang Y L, Li Z W, Liu X Z, Zhu T T, Xie K, Hou Q C, Yan T W, Niu C F, Zhang S W, Yang M B, Xie R R, Wang J, Li J P, An X L, Wan X Y. *ZmFAR1* and *ZmABCG26* regulated by microRNA are essential for lipid metabolism in maize anther. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15):7916
- [32] Xu Q L, Yang L, Kang D, Ren Z J, Liu Y J. Maize MS2 encodes an ATP-binding cassette transporter that is essential for

- anther development. *The Crop Journal*, 2021, 9(6):1301-1308
- [33] Egger R L, Walbot V. A framework for evaluating developmental defects at the cellular level: An example from ten maize anther mutants using morphological and molecular data. *Developmental Biology*, 2016, 419(1):26-40
- [34] 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 Biotechnology Journal*, 2018, 16(2):459-471
- [35] An X L, Ma 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(38):23499-23509
- [36] 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. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(7):1394-1410