

三个大豆 *ms3* 雄性不育突变体的等位突变分析

朱玉雪, 黄圆圆, 徐 研, 付爱根, 徐 敏, 余君萍

(西北大学生命科学学院/西部资源与生物技术教育部重点实验室/陕西省生物技术与生化工程重点实验室, 西安 710069)

摘要: 大豆雄性不育系对发挥大豆杂种优势具有重要价值, 然而传统的三系杂交存在恢复系来源受限等问题, 而环境敏感型细胞核雄性不育系在不同条件下育性可以改变。本文对 *ms3*(Washington)、*ms3*(Flanagan) 和 *ms3*(Plainview) 3 个独立突变体的表型和突变位点展开了进一步研究, 分别进行了不育表型鉴定、高通量测序、分子标记设计及突变位点验证、分析突变对 MS3 蛋白结构的影响、*ms3*(Plainview) 花药半薄切片等实验。实验结果表明突变体花粉大量败育, 只有零星被 I₂-KI 染液染成黑色的不规则花粉粒。高通量测序结果显示, *ms3*(Washington) 和 *ms3*(Flanagan) 在 *MS3* 第 3 个外显子的 PHD 编码区域出现了大片段插入, 导致 MS3 蛋白 PHD 结构域被破坏, 这个等位基因命名为 *ms3-1*; *ms3*(Plainview) 在 *MS3* 第 1 个外显子缺失了一个 A, 导致移码突变, 开放读码框仅编码 40 个氨基酸, 蛋白功能完全丧失, 这个等位基因命名为 *ms3-2*。半薄切片结果显示, 在花药发育中后期 *ms3*(Plainview) 的绒毡层和花粉发育出现异常。综上, 本研究的结果为 *ms3* 的应用和 *MS3* 基因改造提供了材料和依据。

关键词: 大豆; 细胞核雄性不育; *MS3*; PHD 结构域

Allelic Mutation Analysis of Three Male Sterile *ms3* Mutants in Soybean

ZHU Yuxue, HUANG Yuanyuan, XU Yan, FU Aigen, XU Min, YU Junping

(College of Life Sciences, Northwest University / Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education / Shaanxi Province Key Laboratory of Biotechnology and Biochemical Engineering, Xi'an 710069)

Abstract: Soybean male sterile lines play vital value for developing hybrid soybean varieties, while the traditional three-line hybridization system has problems due to a limited number of restorer lines. The environmental sensitive genic male sterile (EGMS) line can switch fertility under different conditions. In this research, the phenotypes and mutation sites of the three independent mutants *ms3* (Washington), *ms3* (Flanagan) and *ms3* (Plainview) were further studied. Phenotypic identification of sterility, high-throughput sequencing, molecular marker design and mutation site verification, analysis of the effect of mutation on MS3 protein structure, *ms3* (Plainview) anther semi-thin section experiments were carried out separately. These results showed that most of the pollens are aborted, only sporadic pollen grains with irregular shape were stained by I₂-KI dye in the anthers of the three mutants. High-throughput sequencing results showed that *ms3* (Washington) and *ms3* (Flanagan) had a large fragment insertion in the PHD coding region of the third exon of the gene *MS3*, eventually compromising the PHD domain of MS3 protein, which was named *ms3-1*. In *ms3* (Plainview), there is one base pair deletion in the first exon of *MS3*, resulting in frameshift mutation encoding only 40 amino acids. The loss-of-function allele was named *ms3-2*. Through semi-thin section analysis of *ms3*

收稿日期: 2023-12-31 网络出版日期: 2024-02-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231231004>

第一作者研究方向为大豆雄性不育基因克隆和功能研究, E-mail: zyx990910@126.com

通信作者: 徐 敏, 研究方向为大豆生殖生物学, E-mail: xumin@nwu.edu.cn

余君萍, 研究方向为大豆生殖生物学, E-mail: junpingyu@nwu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(32000598); 陕西省教育厅自然科学专项(19JK0858); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2023-JC-YB-178); 陕西基础科学(化学、生物学)研究院科学研究计划项目(22JHZ007)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32000598); Shaanxi Province Department of Education Natural Science Project(19JK0858); Natural Science Basic Research Program of Shaanxi(2023-JC-YB-178); Shaanxi Fundamental Science Research Project for Chemistry & Biology (22JHZ007)

(Plainview), its tapetum layer and pollen development were abnormal at the middle and late anther development stage. In summary, this study provided materials and basis for future application and genetic modification of *ms3* and *MS3* in soybean breeding.

Key words: soybean; genic male sterile; *MS3*; PHD domain

大豆起源于中国,是重要的粮食作物,为人类提供植物蛋白和油脂^[1]。亚洲人长期以来的饮食习惯和养殖模式决定了对大豆的大量需求。然而由于我国耕地面积不足、大豆单产不高,导致大豆总产量不足以满足国内需求,因此我国大豆严重依赖进口^[2-3]。为了国家粮食安全发展,提高大豆单产成为育种家的首要目标。杂交育种可以显著提高作物的产量^[4],根据导致雄性不育基因的来源不同,雄性不育可分为细胞核雄性不育和细胞质雄性不育。而细胞核雄性不育又根据其败育的稳定程度分为稳定雄性不育和条件敏感型雄性不育^[5]。条件敏感型雄性不育的育性转换因素一般为光周期、温度和湿度等环境因子,因此又可以分为光敏雄性不育、温敏雄性不育、光温敏雄性不育和湿度敏感型雄性不育。生产上常用的杂交育种体系分为由细胞质雄性不育系介导的三系杂交育种和由光温敏雄性不育系介导的两系杂交育种^[6-9],目前前者已成功应用于大豆杂交种创制^[9]。稳定细胞核雄性不育突变体由于育性稳定、恢复材料广泛,近年来通过转基因技术人工构建保持系也突破了稳定不育系繁种的瓶颈,在杂种优势中应用潜力巨大^[10-14]。

迄今为止,在大豆中已经鉴定出大约30个细胞核雄性不育系,其中 *ms0*、*ms1*~*ms9*、*msh*、*msNJ*、*ms12*^[15-17]属于雄性不育雌性可育类型,*ms1*、*ms2*、*ms3*、*ms4*、*ms6*和 *ms12*^[16,18]不育位点已得到克隆鉴定。*ms1* (*Glyma.13g114200*)编码酪蛋白样蛋白 GmNACK2,该蛋白作为丝裂原活化蛋白激酶(NPK1, nucleus and phragmoplast-localized protein kinase 1)活性的激活剂,在减数分裂过程中发挥作用,在 *ms1* 中 GmNACK2 蛋白被破坏,导致第二次减数分裂结束后,小孢子母细胞无法正常分裂,形成多核小孢子,进而造成雄性不育^[10,19-20]。*ms2* (*Glyma.10g281800*) 在第833位出现一个点突变,T被C取代,异亮氨酸变为苏氨酸,且该基因第3个外显子C端15 bp和第3个内含子N端159 bp的片段被16 bp的新序列取代,发生移码突变,导致氨基酸翻译在102位过早终止^[21]。*MS2* 基因编码 bHLH (Basic Helix-Loop-Helix) 转录因子,参与花药和花粉的发育以及花粉内壁和外壁的形成,而 *ms2* 突变体花药在四分体时

期退化,无法释放小孢子,导致雄性不育^[21]。*ms3* 由 *Glyma.02g107600* 突变导致,该基因编码一个 PHD-finger 结构域,*ms3* 突变体中 PHD 结构域被破坏,导致 *ms3* 出现光敏雄性不育表型^[22]。*ms4* (*Glyma.02g243200*) 则在第3个外显子存在一个碱基A的插入,导致移码突变,终止密码子过早出现,从而产生只含有430个氨基酸的截短蛋白,且截短蛋白中不包含 PHD 蛋白,致使突变体无法产生有活力的花粉^[23]。在 *ms6* (Ames1) 中, *Glyma.13g066600* 存在一个点突变,导致 GmTDF1-1 DNA 结合域的第76位亮氨酸被组氨酸取代。TDF1 (Tapetal Development and Function 1) 是一种 R2R3 MYB 转录因子,在调节绒毡层退化中发挥作用,GmTDF1-1 是大豆中的同源蛋白,在调节绒毡层发育与退化、花药壁层发育和小孢子减数分裂等方面发挥作用,突变体 GmTDF1-1 蛋白被破坏,导致花粉败育^[24]。*ms12* 突变体中编码 CDC20 蛋白的 *MSA* 基因存在 343 bp 的碱基缺失,导致蛋白 C 端 WD40 结构域被破坏。在拟南芥中,CDC20 家族成员在减数分裂染色体的分离中发挥作用,*cdc20.1* 是一个雄性不育突变体,而 *ms12* 的染色体在减数分裂中期(II)在细胞内呈弥散状分布在赤道板上,所以 *MSA* 的候选基因可能是 CDC20 的同源基因^[16]。

最近三年对大豆细胞核雄性不育位点的鉴定和功能报道显示,*ms1*、*ms2*、*ms4*、*ms6* 都是稳定的细胞核雄性不育突变体,只有 *ms3* 是一个条件敏感型细胞核雄性不育突变体。然而,*ms3* 突变体最早于1971年在 Calland×Cutler 的 F₃ 群体中发现,此突变体命名为 *ms3* (Washington),又称为 T273^[25],而后大豆中又发现了两个独立的 *ms3* 突变体,*ms3* (Flanagan) (T284) 和 *ms3* (Plainview) (T291)。*ms3* (Flanagan) (T284) 可能是 Wabash 的天然异交后代,父本未知,其突变等位基因命名为 *ms3* (Flanagan)^[26-27]。*ms3* (Plainview) (T291) 发现于 (Viking×Classic II) × (Mitchell×Columbia) 的 F₂ 群体^[28]。这3个突变体均被报道是稳定的细胞核雄性不育突变体。2009年,Cervantes-Martinez 等^[29]将 *ms3* 定位在2号染色体上两个简单重复序列(SSR, simple sequence repeat) 分子标记 (Satt 157 和 Satt 542) 之间。2022年,Hou

等^[22]发现 *ms3* 由 *Glyma.02g107600* 最后一个外显子末端突变导致,报道的 *ms3* 等位突变在基因第 1882 位之后序列发生了改变,导致终止密码子在第 1885~1887 位提前出现,编码 MS3 蛋白 C 末端只剩部分 PHD 结构域。Hou 等^[22]使用的 *ms3* 突变体育性受到了光周期的调控:日照时长短于 13.5 小时,突变体完全不结荚;日照长于 15.5 小时,突变体单株结荚数为 8~27 个;日照在 13.5~15.5 小时之间(中等长度),单株结荚数为 2~6 个。通过 CRISPR/Cas9 在 Williams 82 中敲除 MS3 基因的 PHD 结构域的完整编码区后,突变植株在中等长度日照条件下不结实^[22]。这说明不同等位突变对 MS3 基因功能的影响是不同。

为探究 *ms3* (Washington), *ms3* (Flanagan) 和 *ms3* (Plainview) 中的 MS3 位点的突变类型,本文对 *ms3* (Washington), *ms3* (Flanagan) 和 *ms3* (Plainview) 的材料分别进行了高通量测序,对相应的 *ms3* 不育位点进行了鉴定,并对 *ms3* 新的等位 *ms3* (Plainview) 突变体进行了表型分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验从美国国家植物种质中心(U.S. National Plant Germplasm System)获得了 3 种 *ms3* 的杂合子后代 T273H (PI 548250)、T284H (PI 548261) 和 T291H (PI 548268),并从中分离出纯合突变体 *ms3* (Washington)、*ms3* (Flanagan) 和 *ms3* (Plainview) 及相应的纯合野生型 MS3 (Washington), MS3 (Flanagan) 和 MS3 (Plainview),用于进一步研究。

以上材料于 2023 年 5 月中下旬种植于陕西省西安市碑林区(108.93 °E, 34.23 °N),种植方式采用室外营养土培养(5~6 株/盆,规格 5.5 cm×5.5 cm×6 cm,口径 5.5 cm,底径 3.5 cm,高度 6 cm),日照时长在 12 h 10 min 至 14 h 30 min。

1.2 突变体的表型鉴定

体式显微镜观察:分别取纯合突变体 *ms3* (Washington)、*ms3* (Flanagan) 和 *ms3* (Plainview) 及相应的纯合野生型 MS3 (Washington)、MS3 (Flanagan) 和 MS3 (Plainview) 初开的花朵(盛开不到 3 小时),置于体式显微镜(目镜放大倍数 10×,物镜放大倍数 0.7~4.5×)下进行解剖观察及拍照。观察内容包括野生型和突变体的完整花朵以及去掉萼片和花瓣之后的雄蕊部分,每种类型的材料观察 3 株,每株观察 3~5 朵。

花粉育性观察(碘染):从开放前一天的花苞中取出花药,置于滴有 I₂-KI 溶液(碘化钾 2g,蒸馏水 300 ml,碘 1g)的载破片上,用镊子夹碎花药释放花粉,用 I₂-KI 溶液染色。染色后样品置于光学显微镜(目镜放大倍数 10×,物镜放大倍数 20×)下,观察花粉在 I₂-KI 溶液中的染色情况,判断花粉育性。

1.3 DNA 提取和高通量测序

大豆基因组 DNA (gDNA) 的高通量测序样品用植物基因组 DNA 试剂盒 (CW0531M, 康为世纪) 提取, *ms3* (Washington)、*ms3* (Flanagan)、*ms3* (Plainview) 和 Williams 82 的叶片 DNA 利用经典 CTAB 法^[30] 提取,取植株顶端幼嫩叶片 100 mg 左右。

之前报道表明 *ms3* 是由于 *Glyma.02g107600* 基因突变而导致的,该基因在 Williams 82 参考基因组 (Wm82.a2.v1) 中的位置为 Gm02:10,270,908~10,267,934 bp。为了探明 3 个 *ms3* 突变体在 *Glyma.02g107600* 位点发生了何种变异,本研究对 3 个突变体材料进行了二代高通量测序。首先通过观察花粉育性区分不育单株,分别选取 *ms3* (Flanagan) 和 *ms3* (Plainview) 各 8 株, *ms3* (Washington) 12 株,取植株顶端大小一致的幼嫩叶片 1~2 片,提取 gDNA 并进行质检,质检合格后,应用华大 DNBSEQ 测序平台进行 PE150 测序,测序深度为 30×。得到测序文件后,将过滤掉低质量和接头污染的 clean reads 用 BWA (Burrows-Wheeler Aligner) 软件比对到参考基因组 Wm82.a2.v1 上。比对得到的 bam 格式文件通过 IGV (Integrative Genomics Viewer) 工具进行查看,SNP 和 InDels 用 GATK 进行检测^[31]。

1.4 PCR 扩增和 Sanger 测序

为了验证 *ms3* 的突变位点,利用大豆基因组 DNA (gDNA) 进行 PCR 扩增。首先, *ms3-2* 突变无法使用常规分子标记进行判断,需采用 PCR-Sanger 测序结合法。因此设计 1 对特异性扩增突变位点的引物 MS3-2F/MS3-2R,获得目的片段(1500 bp 左右),切下目的条带送至生工生物公司(西安),利用上游引物 MS3-2F 进行 Sanger 测序。第二,针对 *ms3-1* 有大片段序列插入的特点,设计 2 对引物,1 对检测 MS3 (MS3WT-1F/MS3WT-1R),另 1 对特异性检测 *ms3-1* (MS3WT-1F/MS3MU-1R)。引物使用 SnapGene 软件设计,引物序列见表 1。PCR 反应体系为 40 μL,含 2×Prime STAR Mix DNA 聚合酶预混液(高保真)(Takara)20 μL,上下游引物各 0.8 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 16.4 μL。PCR 扩增程序为:

98 °C 预变性 1 min; 然后 98 °C 变性 10 s, 53 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15s, 共循环 32 次; 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳 (1×TAE) 进行检验分析。

表 1 鉴定突变位点所用引物

Table 1 Primers for identification of mutation sites

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
MS3-2F	GATAGAAGCTACACAAGTTCC
MS3-2R	GAGTCGATGCCTTCTACTAAC
MS3WT-1F	TAGGAACTACTTGGTTTCGTCG
MS3WT-1R	GGGCTTCATCATTGGAATTCCG
MS3MU-1R	GGCTATCAAAGTAGTTTGACTC

1.5 MS3 蛋白结构的预测

登录 AlphaFold 网站 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>), 输入 MS3 氨基酸序列在线预测蛋白三级结构, 下载预测文件, 使用软件 PyMOL 进行编辑, 分析突变对 MS3 蛋白结构的影响。

1.6 花药半薄切片

ms3(Plainview) 具有一个新的等位突变, 且是一个功能完全丧失型突变体。为了解析 MS3 蛋白完全丧失后对花药发育有何影响, 对 *ms3*(Plainview) 和对应野生型 *MS3*(Plainview) 各发育时期的花药进行半薄切片和显微观察。采集 *MS3*(Plainview) 和 *ms3*(Plainview) 的花序置于 FAA 溶液 (乙醇: 乙酸: 甲醛: 水=5:1:1:3) 中抽气 30 min 以上, 更换新鲜的 FAA 固定液 4 °C 长期保存。固定后的花序经梯度乙醇溶液 (50%、60%、70%、85%、95%) 脱水, 每梯度脱水 10 min, 然后用无水乙醇脱水处理两次, 每次 30 min。完全脱水后的材料经饱和番红乙醇溶液 (番红 1.5 g、无水乙醇 100 ml) 染色 2 h, 采用 Heraeus Kulzer Technovit H7100-GMA 试剂盒 (海德创业生物科技有限公司) 进行渗透和包埋处理, 具体操作步骤如下: 用树脂和无水乙醇等体积混合配制预渗透液, 将材料浸没在预渗透液中处理 2 h。倒掉预渗透液, 将材料浸没在渗透液 (1 g 硬化剂 I 溶解于 100 ml 树脂) 中 4 °C 过夜处理。用镊子将材料摆放在包埋板孔中, 使花苞的顶端朝向包埋板孔的两端, 吸取聚合液 (15 ml 渗透液混合 1 ml 硬化剂 II) 于包埋板孔中至聚合液完全覆盖材料。将包埋板置于 42 °C 烘箱中约 30 min, 待聚合液凝固后, 再将包埋板置于 65 °C 烘箱中, 放置 48 h 以上。用

Leica RM2265 半薄切片机将包埋后的材料切成 2 μm 的薄片, 固定于载玻片上, 用 0.5% 甲苯胺蓝染液染色, 经过中性树胶封片后在光学显微镜下拍照观察。

2 结果与分析

2.1 3个 *ms3* 突变体的表型观察

3 个 *ms3* 突变体与其对应的野生型在花的外观形态一致, 没有明显区别 (图 1A、E、I)。在花盛开初期, 野生型花药已经开裂, 可观察到大量花粉包裹在花药上, 而突变体花药干瘪, 花药上无花粉包裹 (图 1B、F、J)。I₂-KI 染色及显微观察也显示, 野生型花药可以释放大量游离且饱满的圆形花粉粒 (图 1C、G、K), 花粉粒被染成均匀的黑色, 而 3 个 *ms3* 花药中只释放出零星的不正常的花粉粒 (图 1D、H、L), 花粉粒出现抱团、大小形状不规则、无法被染成黑色等状况。*ms3*(Plainview) 花粉败育现象相比其他两个等位尤为严重, 观测视野中基本没有任何花粉粒 (图 1L)。以上观察结果表明, *ms3*(Washington)、*ms3*(Flanagan) 和 *ms3*(Plainview) 花粉在前期发育中就出现了问题。另外发现 *ms3*(Washington) 和 *ms3*(Flanagan) 偶尔会结 1 个荚, 而 *ms3*(Plainview) 从未出现自结荚现象 (结果未显示), 结合花粉观测的结果 (图 1C-D、G-H、K-L), *ms3*(Plainview) 的基因突变可能对花粉发育造成了更不利的影响。通过对 3 个 *ms3* 突变体与其对应的野生型的表型观察可以发现, 3 个 *ms3* 突变体表现出明显的不育特征。

2.2 3个 *ms3* 突变体中的等位突变分析

高通量测序的比对结果显示, *ms3*(Washington) 和 *ms3*(Flanagan) 突变体序列在 Gm02: 10, 268, 024~10, 268, 032 bp 处出现了异常堆积, 没有 reads 可以横跨这个区间, 造成了一个断点, 说明该处有序列插入 (图 2A)。进一步对该区间 reads 进行序列比对, 发现 *ms3*(Washington) 和 *ms3*(Flanagan) 的插入旁邻序列是一致的, 插入事件造成断点处序列 “AGTAGGTGT” 在插入片段两端出现同向重复 (图 2C); 比对到断点两边的 reads 之间没有序列重叠 (图 2C), 根据从断点两端获得的最长的插入序列推断, 该插入片段长度大于 240 bp。测序数据还显示 *ms3*(Washington) 和 *ms3*(Flanagan) 的插入事件与之前发表的 *ms3* 相同^[22] (图 2C), 说明它们的突变位点来源相同, 因此, 将这个等位突变命名为 *ms3-1* (图 3A)。

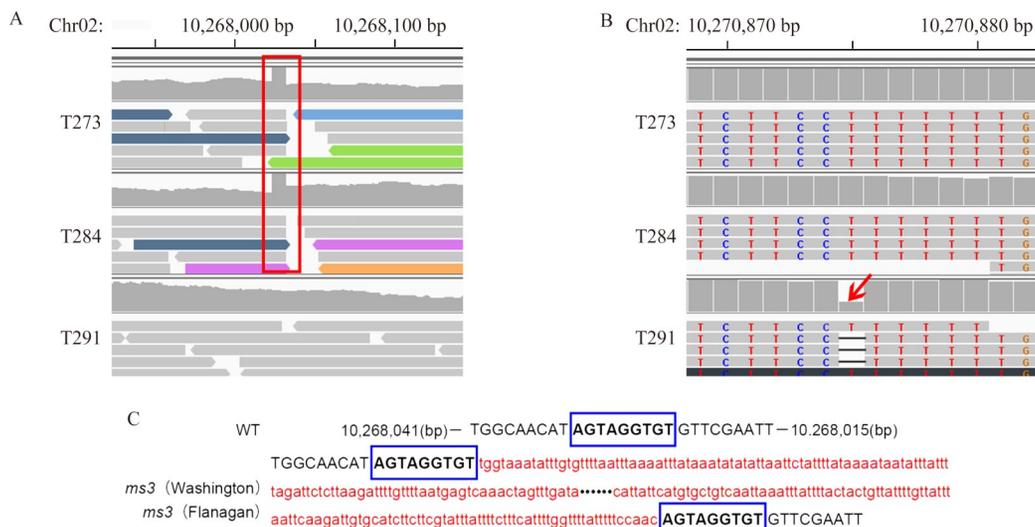


A、B、E、F、I、J: 标尺=1 mm; C、D、G、H、K、L: 标尺=100 μm。红色箭头和蓝色箭头分别指示正常的(左侧)和异常的(右侧)花药表型(B、F、J); 红色三角箭头和蓝色三角箭头分别指示 I₂-KI 染色正常(C、G、K)与异常(D、H、L)的花粉粒; 橙色三角箭头指示 I₂-KI 染色正常, 但形态异常的花药粒(H)

A, B, E, F, I, J: Scale bar=1 mm; C, D, G, H, K, L: Scale bar=100 μm. The red and blue arrows indicate normal (left) and abnormal (right) anther phenotypes (B, F, J); Red and blue arrowhead indicate normal (C, G, K) and abnormal (D, H, L) pollen grains with I₂-KI staining; The orange arrowhead indicates normal stained pollen grains with abnormal morphology (H)

图1 *ms3* 三个等位突变和对应野生型的表型

Fig.1 Phenotypic of three allelic mutations of *ms3* and corresponding wild type

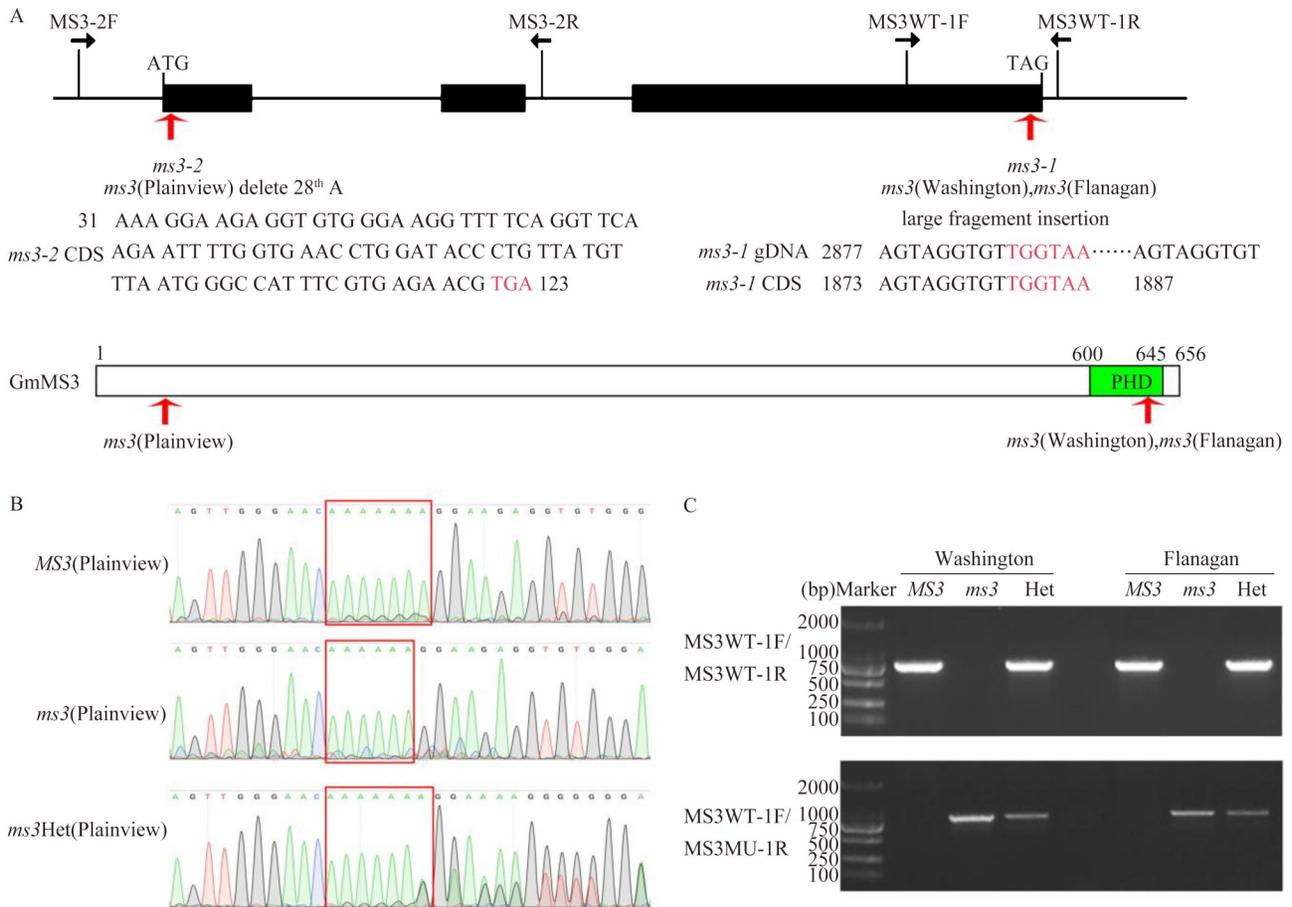


A: *ms3*(Washington)和 *ms3*(Flanagan)的突变位点; 红色矩形框标注异常堆积。B: *ms3*(Plainview)的突变位点; 红色箭头指示的是碱基缺失。C: *ms3*(Washington)和 *ms3*(Flanagan)突变位点reads分析。蓝色的矩形框指示的是插入位点的正向重复序列。红色小写字母指示的是突变体中的插入序列

A: Mutation sites in *ms3* (Washington) and *ms3* (Flanagan); The red rectangle indicates abnormal mapping of reads. B: The mutation site in *ms3* (Plainview); The red arrow points to a base deletion. C: The reads analysis around the *MS3* mutated site of *ms3* (Washington) and *ms3* (Flanagan). The blue rectangles indicate the forward repeat sequence of insertion sites. The red lowercase letters represent the insertion sequence of the mutant

图2 三个 *ms3* 突变体中的等位变异

Fig. 2 Characterization of mutant alleles in three *ms3* lines



A: *MS3*的基因和蛋白结构模式图。红色箭头指示的是突变位点。黑色矩形框指示的是外显子区域。绿色矩形框指示的是MS3蛋白PHD (Plant homeobox domain)结构域。B: PCR测序结果显示 $ms3$ (Plainview)的突变位点。红色矩形框表示 $MS3$ (Plainview)、 $ms3$ (Plainview)和杂合子之间的序列差异。C: 共显性的方法鉴定 $ms3$ (Washington)、 $ms3$ (Flanagan)存在大片段的插入。Marker: DL2000。Het: 杂合子

A: Gene and protein structure model of *MS3*. The red arrow indicates the mutation site. The black rectangular box indicates the exon region. The green rectangle indicates the *MS3* protein PHD (Plant homeobox domain) domain. B: PCR sequencing showed the mutation site of *ms3* (Plainview). The red rectangular box indicates the sequence difference among the *MS3* (Plainview), *ms3* (Plainview) and heterozygotes. C: The co-dominant method identified the presence of large fragment insertion in *ms3* (Washington) and *ms3* (Flanagan). Marker: DL2000. Het: Heterozygote

图3 $ms3$ 等位突变位点的鉴定

Fig.3 Identification of $ms3$ allelic mutation sites

$ms3$ (Plainview)的测序数据显示,它与 $ms3$ (Washington)和 $ms3$ (Flanagan)不同,在Gm02:10,268,024~10,268,032 bp处序列正常(图2A),但在位于Gm02:10,270,875 bp处的T碱基发生了缺失(图2B),由于参考基因组显示的是负链,这个位点对应的是 $Glyma.02g107600$ 基因第28位的A碱基(图3A),是一个新的等位突变,将其命名为 $ms3-2$ 。单碱基缺失导致 $ms3-2$ 出现移码突变,蛋白翻译至第40个氨基酸就提前终止(图3A)。

高通量测序结果确定了 $ms3$ (Washington)、 $ms3$ (Flanagan)和 $ms3$ (Plainview)的突变位点,并将 $ms3$ (Washington)和 $ms3$ (Flanagan)的等位突变命名为

$ms3-1$, $ms3$ (Plainview)的等位突变命名为 $ms3-2$ 。 $ms3-1$ 在 $MS3$ 第3个外显子的PHD编码区域存在一个大片段插入, $ms3-2$ 则在 $MS3$ 第1个外显子缺失了一个碱基A。

2.3 $ms3$ 等位检测的分子标记设计

本研究针对 $ms3-1$ 和 $ms3-2$ 突变位点的特性分别设计分子标记对这两个等位的基因型进行检测。通过 $ms3-2$ 突变体的Sanger测序峰图可以清晰地看出在 $MS3$ (Plainview)样本中第一个外显子区域有7个碱基A,而在 $ms3$ (Plainview)样本中该区域只有6个碱基A,而杂合子在第7个碱基的位置是一个双峰(A/G),说明 $ms3$ (Plainview)在第一个外显子上

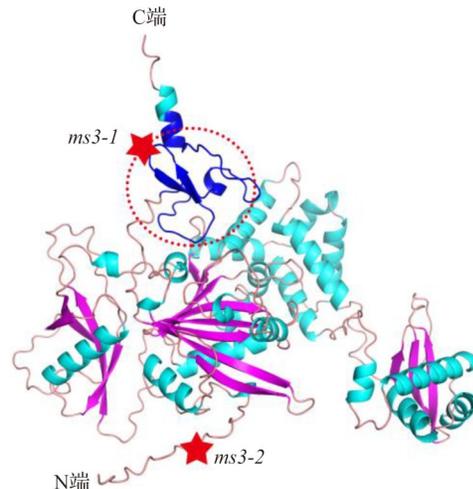
缺少了一个碱基 A(图 3B)。这与图 2B 中的高通量测序结果(由于 *Glyma.02g107600* 基因在染色体上是反向互补的,所以高通量测序结果显示是缺失碱基 T)一致,证明该位点确实发生了突变,而且这对分子标记可以有效的对 *ms3*(Plainview)的基因型进行鉴定(图 2B)。*ms3-1* 突变存在一个大片段序列插入,设计的 2 对引物中 1 对(MS3WT-1F/MS3WT-1R)检测野生型 MS3,另 1 对引物(MS3WT-1F/MS3MU-1R)特异性检测突变型 *ms3-1*。2 对引物共用同 1 个正向引物 MS3WT-1F,此引物位于插入位点的上游;扩增 MS3 的反向引物 MS3WT-1R 设计在突变位点的下游,扩增 *ms3-1* 的反向引物 MS3MU-1R 设计在插入序列上(图 3A)。纯合 MS3 基因型可以用引物对 MS3WT-1F/MS3WT-1R 扩增出 780 bp 的条带,*ms3-1* 基因型可以用引物对 MS3WT-1F/MS3MU-1R 扩增出 874 bp 的条带,杂合子使用上述 2 对引物都能扩增出条带(图 3C)。这 2 对引物一起可以组成一对共显性分子标记,为 *ms3-1* 基因型的鉴定建立了更为便捷的方法。因此,针对 *ms3-1* 和 *ms3-2* 这两个等位突变分别设计的两种分子标记及鉴定的实验结果也证实了两个等位基因序列的正确性及鉴定方法的有效性。

2.4 突变对蛋白结构的影响

Glyma.02g107600(MS3)由 3 个外显子和 2 个内含子构成(图 3A),编码长 656 个氨基酸的多肽链,在氨基酸残基 600 和 645 之间存在一个 PHD-finger 结构域。从 MS3 蛋白三级结构图中可以看到,蛋白的 N 末端是散环结构,C 末端是一个由两个反向平行的 β 折叠片和一个 α 螺旋组成的 PHD-finger 结构(图 4)。*ms3-2* 在第一个外显子上缺少了一个碱基 A,导致开放阅读框发生移码突变,仅编码 40 个氨基酸,移码位点在 N 末端的散环区(图 4),导致 MS3 蛋白结构基本完全丧失,因此,*ms3-2* 应该是一个功能完全丧失突变体(null mutation)。而 *ms3-1* 的插入导致 PHD-finger 结构域的翻译在第一个 β 折叠片后终止(图 4)。通过对蛋白结构的推断,本研究中 *ms3*(Washington)和 *ms3*(Flanagan)突变体雄性不育可能就是由于 PHD 结构域遭到了破坏,无法产生正常的可育花粉。

2.5 花药半薄切片观察

花药发育至四分体时期(S8期),*ms3*(Plainview)



被红色虚线圆圈标出的深蓝色区域显示了 MS3 蛋白的 PHD 结构域;五角星分别指示两个突变蛋白的氨基酸突变起始位点

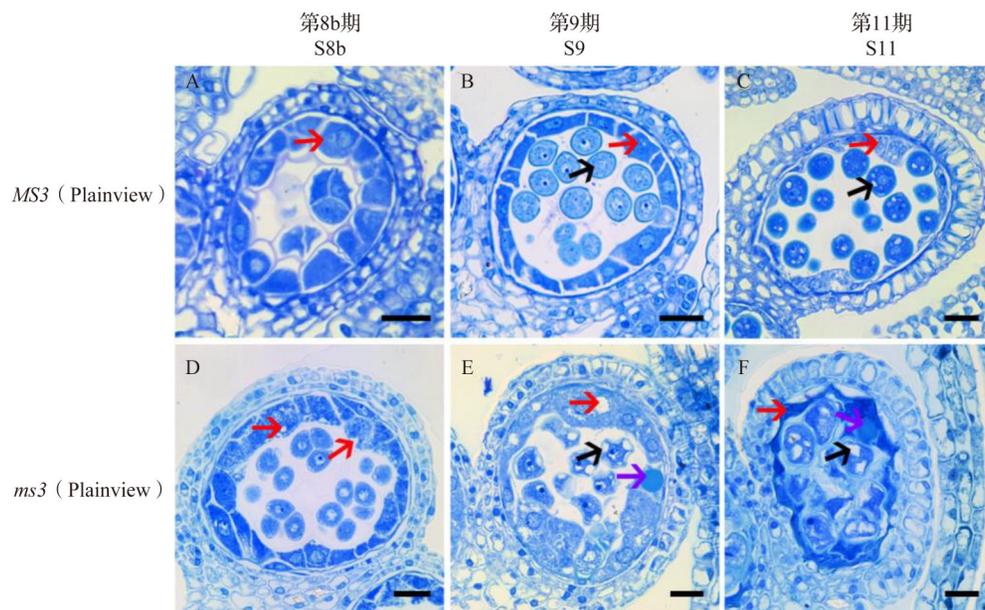
The dark blue area marked by a red dashed circle shows the PHD domain of the MS3 protein; The pentagram indicates the amino acid mutation initiation sites of the two mutant proteins respectively

图 4 MS3 蛋白三级结构

Fig.4 Tertiary structure of MS3 protein

与 MS3(Plainview)开始出现不同,主要表现在 *ms3*(Plainview)绒毡层开始出现小的空泡化,但此时,四分体的形态没有明显区别,四分体被花粉囊腔内填充的胼胝质包裹(图 5A,D)。花药发育至自由小孢子时期(S9)期,可育花药中自由小孢子处于游离状态,绒毡层进一步浓缩(图 5B)。而 *ms3*(Plainview)小孢子形状开始不规则,部分出现空泡化,绒毡层边缘有小颗粒物质出现,向花粉囊腔凸出,挤压小孢子的生存空间(图 5E)。花药发育至 S11 期时,内皮层呈现出空泡膨大的状态,此时可育花药的体壁细胞层和绒毡层进一步降解,为花粉粒的发育提供营养物质(图 5C)。而 *ms3*(Plainview)突变体花药绒毡层依然处于深度着色的状态,表明绒毡层中的营养物质不能向小孢子(花粉粒)转移,此外壁细胞层和绒毡层进一步挤压花粉囊腔内含物,此时花粉粒的发育似乎停滞,依然是不规则的空泡化(图 5F)。

通过观察 *ms3*(Plainview)与 MS3(Plainview)的花药半薄切片图像,发现 *ms3*(Plainview)在花药发育的中后期绒毡层和花粉发育出现异常,导致花粉败育。半薄切片的结果与花药碘染后只有零星花粉粒被染成黑色的结果一致,说明 MS3 在绒毡层降解和小孢子发育调控过程中发挥着决定性的作用。



红色箭头分别标注的是正常的(A~C)和异常的(E~F)绒毡层细胞。黑色箭头指示的是饱满的(B~C)和空泡化的(E~F)小孢子。紫色箭头指示的是绒毡层中出现的异常颗粒(E~F)。比例尺=25 μm

Red arrows indicate the normal (A~C) and abnormal (E~F) tapetum cell. The black arrows indicate the plump and vacuolated microspores. The purple arrows point the abnormal granular particles(E~F). Scale =25 μm

图5 *MS3*(Plainview)和*ms3*(Plainview)突变体花药半薄切片

Fig.5 Anther semi-thin sections of *MS3*(Plainview) and *ms3*(Plainview)

3 讨论

植物同源异型结构域PHD是锌指结构域家族的一类转录调控因子,主要在细胞核中发挥作用,可以作为激活因子或抑制因子两种形式参与转录调控作用,可以与各种组蛋白修饰酶相互作用^[32-34],在单子叶植物与双子叶植物的雄配子发育调控过程中功能保守^[23]。目前的研究表明,PHD转录因子参与雄配子发育的调控主要涉及减数分裂和绒毡层降解及小孢子发育过程^[34]。大豆雄性不育基因*MS4*及其拟南芥同源基因*MMD1*(*MALE MEIOCYTE DEATH1*)都有参与减数分裂末期胞质分裂过程的报道,并且*MS4*与*MMD1*编码蛋白的PHD结构域被破坏会导致小孢子发育异常,造成花粉大量败育^[23,35]。大豆*MS3*、拟南芥*MS1*、玉米*ZmMS7*以及水稻*PTC1*(*PERSISTANT TAPETAL CELL1*)/*OsMS1*均被报道参与绒毡层降解过程,且几种同源蛋白的缺失均会影响绒毡层程序性死亡的正常进行,导致出现绒毡层增殖失控、降解延迟以及小孢子逐渐坏死等发育异常行为,说明在进化过程中该蛋白的功能相对保守^[22,36-38]。在本研究中,*ms3*(Plainview)突变体在发育后期也出现了绒毡层和花药发育异常的现象,可能与其发生移码突变、无法编码正常的PHD功能蛋白有关。

ms3(Washington)和*ms3*(Flanagan)突变体在PHD结构域区域产生了大片段插入突变,导致PHD结构域的受损。*ms3*(Plainview)突变体则是由于第一个外显子上单碱基的缺失导致翻译提前终止,最终导致功能蛋白的缺失。本研究中,*ms3*(Plainview)的花粉败育现象比*ms3*(Washington)与*ms3*(Flanagan)更为严重。在观察3个突变体结实情况时发现,*ms3*(Washington)与*ms3*(Flanagan)偶尔会结1个荚,而*ms3*(Plainview)从未发现结实现象。表明2种突变形式导致的突变在最终结实性上存在一定的差异性。相应地,在Hou等^[22]的研究中,经CRISPR/Cas9编辑得到的*MS3*-KO突变体PHD结构域被完全破坏,几乎不产生花粉粒和自交豆荚,与本研究中的*ms3*(Plainview)的突变类型与表型一致。而天然等位突变*ms3*及本研究中的*ms3*(Washington)和*ms3*(Flanagan)只是缺失了部分PHD结构域,偶尔能观察到零星的花粉粒。这些现象说明大豆*MS3*蛋白PHD结构域的完整性对雄性育性也存在一定影响。

ms3(Washington)和*ms3*(Flanagan)的突变位点与Hou等^[22]鉴定到的*ms3*突变位点一致,并观察到了自交结实现象,但结实率较低,可能与材料种植条件有关。在Hou等^[22]的研究中,*ms3*在 ≤ 13 h 30 min的短日照条件下完全不育,但在 ≥ 15 h 45 min的长

日照条件下育性恢复。本研究中的 *ms3*(Flanagan)、*ms3*(Washington) 和 *ms3*(Plainview) 种植于西安(34°23'N), 生长期间的日照时长在 12 h~14 h 30 min 之间, 其自交结实率低可能是材料种植维度偏低、光照时长不足导致的。而 *ms3*(Plainview) 突变材料从未观察到结实现象, 可能是因为 *ms3*(Plainview) 在第一个外显子处产生了移码突变, 造成了整个蛋白功能的缺失, 所以表现出完全不育的现象。同样的情况在大豆 MS3 的水稻同源物 PTC1/OsMS1 中也存在。PHD 结构域缺失的水稻 *ptc1* 突变体产生完全不育的表型^[38]; 而在保守“LXXLL”基序中由亮氨酸转变为脯氨酸的突变体 *tgms-9* 和 *osms1^{wenmin}* 呈现出温敏雄性不育的表型^[39-40]。 *tgms-9* 和 *osms1^{wenmin}* 突变体在低温下(22 °C)育性正常, 随着温度的升高(23~29 °C), 突变体表现出温敏雄性不育的表型^[39-40]。虽然大豆 MS3 和水稻 MS1(*PTC1*) 同样被证明是条件敏感型雄性不育基因, 但是两种作物中突变体的育性转换条件却不尽相同。其具体的调控机制可能与突变位点不一致有关(“LXXLL”保守的基序与温敏机制有关, 而 PHD 结构域与光敏机制有关), 也可能是不同物种差异导致。有必要进行更为细致的研究来回答, 比如在大豆中对保守的“LXXLL”进行单碱基编辑, 或者是在水稻中对 PHD 结构域进行敲除来进行分析。

上述研究表明, 发生在 PHD-finger 结构域的突变, 通常与条件敏感型不育突变体的形成密切相关。因此, *ms3*(Washington) 和 *ms3*(Flanagan) 作为条件敏感型不育突变体可以考虑将来作为两系杂交育种的环境敏感型细胞核雄性不育系材料使用。而 *ms3*(Plainview) 突变体的突变位点与 Hou 等^[22] 鉴定到的突变位点不同, 并且表现彻底败育的表型, 可以作为一种稳定的雄性不育材料用作种质资源筛选。本研究明确了种质资源库中 3 种突变体的具体突变类型, 发现了一个新的功能完全缺失型等位突变(*ms3-2*), 解析了其对育性的影响, 并开发了验证 *ms3-1* 和 *ms3-2* 基因型的鉴定方法, 对 *ms3* 突变体和 MS3 基因资源在杂交育种工作中的应用有着一定的指导意义。

参考文献

- [1] Li Y H, Qin C, Wang L, Jiao C Z, Hong H L, Tian Y, Li Y F, Xing G H, Wang J, Gu Y J, Gao X P, Li D L, Li H Y, Liu Z X, Jing X, Feng B B, Zhao T, Guan R X, Guo Y, Liu J, Yan Z, Zhang L J, Ge T L, Li X K, Wang X B, Qiu H M, Zhang W H, Luan X Y, Han Y P, Han D Z, Chang R Z, Guo Y L, Reif J C, Jackson S A, Liu S, Tian S L, Qiu L J. Genome-wide signatures of the geographic expansion and breeding of soybean. *Science China: Life Sciences*, 2023, 66(2):350-365
- [2] Li J J, Nadeem M, Sun G L, Wang X B, Qiu L J. Male sterility in soybean: Occurrence, molecular basis and utilization. *Plant Breeding*, 2019, 138(6):659-676
- [3] 郭文, 代希茜, 莫楠, 张应青, 余晨, 田江, 耿智德, 李露. 东盟国家大豆种植及其大豆产品进出口结构分析. *中国农学通报*, 2022, 38(23):156-164
Guo W, Dai X X, Mo N, Zhang Y Q, Yu C, Tian J, Geng Z D, Li L. Soybean planting and soybean commodities' import and export trade structure in ASEAN countries. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(23):156-164
- [4] 孙小媛, 王一帆, 王韞慧, 蔺佳雨, 李金红, 丘远涛, 方小龙, 孔凡江, 李美娜. 大豆细胞核雄性不育基因研究进展. *遗传*, 2021, 43(1):52-65
Sun X Y, Wang Y F, Wang Y H, Lin J Y, Li J H, Qiu Y T, Fang X L, Kong F J, Li M N. Progress on genic male sterility gene in soybean. *Hereditas*, 2021, 43(1):52-65
- [5] Chen L T, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual review of plant biology*, 2014, 65(1):579-606
- [6] Huang J Z, E Z G, Zhang H L, Shu Q Y. Workable male sterility systems for hybrid rice: Genetics, biochemistry, molecular biology, and utilization. *Rice (N Y)*, 2014, 7(1):13
- [7] Cheng S H, Zhuang J Y, Fan Y Y, Du J H, Cao L Y. Progress in research and development on hybrid rice: A super-domesticated in China. *Annals of Botany*, 2007, 100(5):959-966
- [8] Chen L Y, Lei D Y, Tang W B, Xiao Y H. Thoughts and practice on some problems about research and application of Two-line hybrid rice. *Rice Science*, 2011, 18(2):79-85
- [9] 杨绪磊, 郭凤兰, 高萌萌, 张泽东, 林春晶, 孙妍妍, 张井勇, 彭宝, 赵丽梅, 张春宝. 大豆 CMS-RN 型不育系育性恢复基因 *GmRf1* 的初步鉴定及其分子标记开发. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(4):1186-1193
Yang X L, Guo F L, Gao M M, Zhang Z D, Lin C J, Sun Y Y, Zhang J Y, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Preliminary identification and molecular marker development of the restorer-of-fertility Gene *GmRf1* of CMS-RN type sterile lines in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(4):1186-1193
- [10] Nadeem M, Chen A D, Hong H L, Li D D, Li J J, Zhao D, Wang W, Wang X B, Qiu L J. *GmMs1* encodes a kinesin-like protein essential for male fertility in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(6):1054-1064
- [11] Nie Z X, Zhao T J, Liu M F, Dai J Y, He T T, Lyu D, Zhao J M, Yang S P, Gai J Y. Molecular mapping of a novel male-sterile gene *ms_{Nr}* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Reproduction*, 2019, 32(4):371-380
- [12] Song S F, Wang T K, Li Y X, Hu J, Kan R F, Qiu M D,

- Deng Y D, Liu P X, Zhang L C, Dong H, Li C X, Yu D, Li X Q, Yuan D Y, Yuan L P, Li L. A novel strategy for creating a new system of third-generation hybrid rice technology using a cytoplasmic sterility gene and a genic male-sterile gene. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(2):251-260
- [13] 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
- [14] 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. *Molecular Plant*, 2019, 12(3):321-342
- [15] Yang Y, Speth B D, Boonyoo N, Baumert E, Atkinson T R, Palmer R G, Sandhu D. Molecular mapping of three male-sterile, female-fertile mutants and generation of a comprehensive map of all known male sterility genes in soybean. *Genome*, 2014, 57(3):155-160
- [16] 张宇. 大豆雄性不育基因的克隆及其功能研究. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2019
Zhang Y. Cloning and functional analysis of soybean male sterility gene. Harbin: Harbin Normal University, 2019
- [17] 李维, 余君萍, 徐敏. 大豆细胞核雄性不育的理论与应用研究进展. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2021, 49(3): 60-70
Li W, Yu J P, Xu M. Advances in theory and application of genic male sterility in soybean. *Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition*, 2021, 49(3): 60-70
- [18] Fang X L, Sun Y Y, Li J H, Li M N, Zhang C B. Male sterility and hybrid breeding in soybean. *Molecular Breeding*. 2023, 43(6):47
- [19] Jiang B J, Chen L, Yang C Y, Wu T T, Yuan S, Wu C X, Zhang M C, Gai J Y, Han T F, Hou W S, Sun S. The cloning and CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of a male sterility gene *MS1* of soybean. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(6):1098-1100
- [20] Fang X L, Sun X Y, Yang X D, Li Q, Lin C J, Xu J, Gong W J, Wang Y F, Liu L, Zhao L M, Liu B H, Qin J, Zhang M C, Zhang C B, Kong F J, Li M N. *MS1* is essential for male fertility by regulating the microsporocyte cell plate expansion in soybean. *Science China: Life Sciences*, 2021, 64(9):1533-1545
- [21] Fang X L, Feng X C, Sun X Y, Yang X D, Li Q, Yang X L, Xu J, Zhou M H, Lin C J, Sui Y, Zhao L M, Liu B H, Kong F J, Zhang C B, Li M N. Natural variation of *MS2* confers male fertility and drives hybrid breeding in soybean. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(11):2322-2332
- [22] Hou J J, Fan W W, Ma R R, Li B, Yuan Z H, Huang W X, Wu Y Y, Hu Q, Lin C J, Zhao X Q, Peng B, Zhao L M, Zhang C B, Sun L J. *MALE STERILITY 3* encodes a plant homeodomain-finger protein for male fertility in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(5):1076-1086
- [23] Thu S W, Rai K M, Sandhu D, Rajangam A, Balasubramanian V K, Palmer R G, Mendu V. Mutation in a PHD-finger protein *MS4* causes male sterility in soybean. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1):378
- [24] Yu J P, Zhao G L, Li W, Zhang Y, Wang P, Fu A G, Zhao L M, Zhang C B, Xu M. A single nucleotide polymorphism in an R2R3 MYB transcription factor gene triggers the male sterility in soybean *ms6* (*Ames1*). *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(11):3661-3674
- [25] Palmer R G, Johns C W, Muir P S. Genetics and cytology of the *ms3* male-sterile soybean. *Journal of Heredity*, 1980, 71(5):343-348
- [26] Chaudhari H K, Davis W H. A new male-sterile strain in Wabash soybeans. *Journal of Heredity*, 1977, 68(4):266-267
- [27] Graybosch R A, Palmer R G. Analysis of a male sterile character in soybeans. *Journal of Heredity*, 1987, 78(2):66-70
- [28] Skorupska H T, Palmer R G. Additional sterile mutations in soybean *Glycine max* (L.) Merr. *Journal of Heredity*, 1990, 81(4):296-300
- [29] Cervantes-Martinez I, Sandhu D, Xu M, Ortiz-Pérez E, Kato K K, Horner H T, Palmer R G. The male sterility locus *ms3* is present in a fertility controlling gene cluster in soybean. *The Journal of Heredity*, 2009, 100(5):565-570
- [30] Allen G C, Flores-Vergara M A, Krasynanski S, Kumar S, Thompson W F. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocol*, 2006, 1(5):2320-2325
- [31] 黄琬婷, 王茜, 张泽燕, 朱慧珺, 闫虎斌, 张耀文. 基于BSA-seq技术定位绿豆种皮颜色基因. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(3): 790-800
Huang W T, Wang X, Zhang Z Y, Zhu H J, Yan H B, Zhang Y W. Mapping of seed coat color related genes by BSA-seq in Mung Bean (*Vigna radiata* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(3): 790-800
- [32] 连娟, 刘永杰, 李丹, 公杰, 王永波, 陈现朝, 张凤廷, 赵昌平, 高世庆, 赵宝存. 小麦PHD基因家族鉴定及干旱胁迫应答分析. *分子植物育种*, 2023, 21(18):5917-5928
Lian J, Liu Y J, Li D, Gong J, Wang Y B, Chen X C, Zhang F Y, Zhao C P, Gao S Q, Zhao B C. Identification and drought stress response analysis of PHD gene family in *Triticum aestivum* L.. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(18):5917-5928
- [33] 宋扬, 张海龙, 王明晶, 刘宇麒, 李立新. 蒺藜苜蓿锌指蛋白PHD-Finger家族鉴定和表达分析. *植物生理学报*, 2021, 57(7):1559-1572
Song Y, Zhang H L, Wang M J, Liu Y Q, Li L X. Genome-wide identification and expressional analysis of Zinc Finger Protein PHD-Finger family in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(7):1559-1572
- [34] 王天一, 王应祥, 尤辰江. 植物PHD结构域蛋白的结构与功

- 能特性. 遗传, 2021, 43(4):323-339
- Wang T Y, Wang Y X, You C J. Structural and functional characteristics of plant PHD domain-containing proteins. *Hereditas*, 2021, 43(4):323-339
- [35] Graybosch R A, Palmer R G. Male sterility in Soybean (*Glycine max*). II. phenotypic expression of the *ms4* mutant. *American Journal of Botany*, 1985, 72(11):1751-1764
- [36] Yang C Y, Vizcay-Barrena G, Conner K, Wilson Z A. MALE STERILITY1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell*, 2007, 19(11):3530-3548
- [37] 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
- [38] 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 Physiology*, 2011, 156(2):615-630
- [39] Qi Y B, Liu Q L, Zhang L, Mao B Z, Yan D W, Jin Q S, He Z H. Fine mapping and candidate gene analysis of the novel thermo-sensitive genic male sterility *tms9-1* gene in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 127(5):1173-1182
- [40] Wu L Y, Jing X H, Zhang B L, Chen S J, Xu R, Duan P G, Zou D N, Huang S J, Zhou T B, An C G, Luo Y H, Li Y H. A natural allele of *OsMSI* responds to temperature changes and confers thermosensitive genic male sterility. *Nature Communications*, 2022, 13(1):2055