

一个玉米 CMS-C 恢复基因的精细定位

杨 殊¹, 石海春^{1,2}, 赵长云², 余学杰^{1,2}, 夏 伟², 柯永培^{1,2}

(¹ 四川农业大学农学院, 成都 611130; ² 四川正红生物技术有限责任公司, 成都 610213)

摘要:为挖掘玉米 C 型细胞质雄性不育 (CMS-C, C-type cytoplasmic male sterility) 的育性恢复基因并解析基因功能, 用恢复系 K932R 与 2 个 CMS-C 同质异核不育系 K169S 和 K932S 分别构建 2 个 F₂ 定位群体, 结合 SSR 分子标记和分离群体分析法全基因组重测序 (BSA-reseq) 技术定位育性恢复基因, 通过 PCR 技术克隆目的基因并进行基因表达分析。结果表明, 用 BSA-SSR 分子标记法将育性恢复基因 *Rf 932* 定位于 8 号染色体短臂, 位于 SSR 标记 8-21 与 8-30 之间, 遗传距离分别为 2.3 cM 和 7.7 cM; 通过 BSA-reseq 技术, 将 *Rf 932* 定位于 8 号染色体 0.38Mb 的区域, 包含 7 个候选基因; 对候选基因分段克隆和测序比对, 获得 *Rf 932* 序列全长 2549 bp, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 编码 385 个氨基酸; 其中控制育性恢复的关键位点发生了与 *Rf4* 相同的氨基酸变异 F187Y, 是 1 个新的 *Rf4* 等位基因; 该基因编码 bHLH 转录因子, 调控绒毡层发育; 据 qRT-PCR 分析, *Rf 932* 在不育系与恢复系花药中 3 个发育时期的表达量均无显著差异。研究结果丰富了玉米 CMS-C 恢复基因库, 并为进一步解析育性恢复机理奠定了基础。

关键词: 玉米; 细胞质雄性不育; 恢复基因 *Rf 932*; SSR 分子标记; 全基因组重测序

Fine Mapping of a CMS-C Restorer Gene in Maize

YANG Shu¹, SHI Hai-chun^{1,2}, ZHAO Chang-yun², YU Xue-jie^{1,2}, XIA Wei², KE Yong-pei^{1,2}

(¹ College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130;

² Sichuan Zhenghong Biotechnology Co. Ltd., Chengdu 610213)

Abstract: To explore the fertility restorer genes of CMS-C (C-type cytoplasmic male sterility) in maize, and analyze the gene functions, two F₂ mapping populations were developed with restorer line K932R and two CMS-C allogeneic heterogeneous sterile lines K169S and K932S, respectively. Combined with SSR molecular markers and BSA-reseq technology, the fertility restorer gene in K932R was mapped. The target gene was cloned by PCR technology and gene expression analysis was performed. The results showed that the fertility restorer gene *Rf 932* was mapped on the short arm of chromosome 8 by BSA-SSR molecular markers, between SSR markers 8-21 and 8-30, with the genetic distance of 2.3 cM and 7.7 cM, respectively. *Rf 932* was located in a 0.38 Mb region on chromosome 8 by BSA-reseq technology, which contained 7 candidate genes. After the candidate genes being cloned in segments and aligned in sequences, *Rf 932* was obtained with a full length of 2549 bp, consisting of 4 exons and 3 introns, encoding 385 amino acids. One of the key sites controlling fertility restoration, F187Y, had the same amino acid variation as *Rf4*, which was a new *Rf4* allele. *Rf 932* encoded a bHLH transcription factor that regulated the tapetum development. qRT-PCR analysis showed that there was no significant difference in the relative expression levels of *Rf 932* in anthers between the sterile line and the restorer line at 3 developmental stages. The results enriched the restore gene bank of maize CMS-C, and laid a foundation for further analyzing the mechanism of fertility restoration.

收稿日期: 2021-06-23 修回日期: 2021-08-02 网络出版日期: 2021-08-10

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210623001>

第一作者研究方向为玉米遗传育种, E-mail: yangshu1013@163.com

通信作者: 柯永培, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: keyp169@163.com

基金项目: 四川省重点研发项目 (2021YFYZ0017); 四川省科技支撑计划项目 (2016NYZ0006)

Foundation projects: Key R&D Project of Sichuan Province (2021YFYZ0017), Science and Technology Support Plan Project of Sichuan Province (2016NYZ0006)

Key words: maize; cytoplasmic male sterility; restorer gene *Rf 932*; SSR molecular marker; whole-genome resequencing

植物细胞质雄性不育(CMS, cytoplasmic male sterility)是杂种优势利用的理想工具,可解决因人工去雄不彻底造成的种子纯度等问题,给杂交种子生产带来极大便利。玉米CMS包括S型、T型和C型3种类型,其中C型细胞质雄性不育(CMS-C)具有败育时期早、败育彻底、不育系育性稳定等优点,因而具有良好的应用前景^[1]。

Kheyr-Pour等^[2]研究发现,玉米CMS-C育性恢复受1个显性单基因*Rf4*控制;另有研究表明,CMS-C育性恢复由3个基因控制,分别是*Rf4*、*Rf5*及*Rf6*^[3],可能还受一些微效基因位点影响^[4]。Sisco^[5]将*Rf4*定位于8号染色体的8.01位点;邵可可^[6]将*Rf4*定位于8号染色体上的SSR标记X-21-1和X-33之间,物理距离大约为60000Nt;Jennifer等^[7]将*Rf4*定位于8号染色体短臂的1个12 kb区域内,包含2个候选基因,并利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,证实了其中1个候选基因GRMZM2G021276是*Rf4*。汤继华等^[8]利用SSR分子标记将*Rf5*定位于5号染色体5.07位点。此外,Kohls等^[4]将涉及CMS-C育性部分恢复的多个QTLs定位于2号染色体2.09、3号染色体3.06和7号染色体7.03区域。

目前,由于玉米CMS-C恢复系资源相对匮乏以及对育性恢复机制认识不足,限制了玉米CMS-C“三系”配套在生产上的应用。因此,挖掘更多的育性恢复基因,研究育性恢复机理,具有重要的理论和实践意义。本研究以玉米恢复系K932R与2个CMS-C同质异核不育系K169S和K932S为材料,分别构建2个F₂定位群体,结合SSR分子标记和BSA全基因组重测序(BSA-reseq)方法,进行K932R恢复基因定位,以期获得候选基因;并对候选基因进行克隆和表达分析,解析基因功能,为育种应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

恢复系:K932R;同质异核不育系:K932S、K169S;保持系:K169。以K932R与K932S、K169S分别构建2个F₂定位群体。其中,K932S来源于自然突变不育株;K932R为K932S的近等基因恢复系;K169

为优良可育自交系;K169S为K932S与K169杂交,通过回交10代以上获得的不育系。以上材料均由四川正红生物技术有限责任公司提供。

2020年春季,在成都种植K932S、K932R、K169S和K169各5行,K169S×K932R F₁、K932S×K932R F₁各6行,K169S×K932R F₂共541株,K932S×K932R F₂共571株。试验行长3.0 m,行距0.8 m,窝距0.5 m,每行7窝,种植密度50000株/hm²,3粒/窝,不匀苗;田间管理同一般大田生产。

从散粉初期开始每天进行单株育性调查。Zhou等^[9]发现,K932S属于CMS-C无花粉型雄性不育系,因此可直接采用目测法观察花药败育情况,划分可育株和不育株,并进行 χ^2 测验。

1.2 基于SSR分子标记的初定位

根据育性鉴定结果,从K169S×K932R F₂群体中选取可育、不育各10株,提取DNA分别等量混合,构建可育、不育基因池。采用SSR分子标记结合混合群体分离分析法^[10]进行定位,选取玉米染色体上的513对SSR引物于亲本K169S和K932R间进行多态性筛选,进一步在可育、不育基因池间筛选,共筛选出4个可用的SSR标记,分别是8-49、8-33、8-30和8-21(表1),之后在定位群体中的129个不育单株间进行扩增。2×CTAB法提取DNA,PCR体系为25 μ L,扩增产物用3%琼脂糖凝胶进行电泳,凝胶成像系统成像观察,JoinMap 4.0软件进行连锁分析,并绘制遗传图谱。

1.3 基于BSA-reseq的精细定位

从K932S×K932R F₂群体选取可育、不育单株各30株,提取DNA分别等量混合,构建可育池和不育池,同时选取双亲各1株提取DNA。利用Illumina HiSeq X Ten平台对2个混池和双亲分别展开30×和10×全基因组重测序。通过BWA软件比对到玉米参考基因组B73_RefGen_v4(Details-Zea_mays-Ensembl Genomes 63(gramene.org))^[11]。采用GATK3.3软件工具包模块进行SNPs和InDels的检测^[12]。过滤测序数据获得高质量SNPs位点,采用欧氏距离和 Δ SNP-index进行关联分析^[13],关联效果越好,欧氏距离与 Δ SNP-index越高。

1.4 候选基因同源克隆与序列分析

参考候选基因序列设计交叉引物,其中引物

8171-1、8171-2 和 8171-3 对应基因 *Zm00001d008171*, 引物 8172 对应基因 *Zm00001d008172*、引物 8173 对应基因 *Zm00001d008173*、引物 8174 对应基因 *Zm00001d008174*, 引物 8175 对应基因 *Zm00001d008175*

(表 1)。对 K932R、K169、K169S 和 K932S DNA 进行扩增,电泳后回收纯化,连接载体转化,分别挑选出与预测片段大小一致的阳性克隆测序,用 DNAMAN 软件进行序列拼接和比对。

表 1 引物序列及作用

Table 1 Sequence and use of primers

名称 Name	正向序列 (5'-3') Forward sequence	反向序列 (5'-3') Reverse sequence	引物作用 Use of primers
8-49	GAGGAGCTGTCCTCGAATTG	AGAGCAGAGCAGACCAGAGC	SSR 分子标记定位
8-33	CCAACGCTTTTTCTCAAACA	ACGAATGCACGATCAACAAA	SSR 分子标记定位
8-30	ATCGGGAGAGTCCTTCACAC	TCGCATTACGTTTTGGTAA	SSR 分子标记定位
8-21	CCACTGTGCCATCTCTGTGT	GAGAATGGCTCCGATACCAA	SSR 分子标记定位
Actin	TCACCCTGTGCTGCTGACCG	GAACCGTGTGGCTCACACCA	qRT-PCR 分析
ZmbHLH16	CCTCATGCACCTCATACC	CAGCTCCTGGATGTACTC	qRT-PCR 分析
8171-1	AAACTATGAAAGTGGTGGA	ATGCTGCTGTCTGTAGTCA	克隆 <i>Zm00001d008171</i>
8171-2	TGGCTTGGTCTTCGGAATTG	CAGAGTGCCCTGGCGACAA	克隆 <i>Zm00001d008171</i>
8171-3	CTGCGATGGGATATGGGATG	AAACTTTGTTCCCAAACAGG	克隆 <i>Zm00001d008171</i>
8172	GCCTCCACAAAAATCGTCGT	CCGGGGTTCGTAGCAATGTC	克隆 <i>Zm00001d008172</i>
8173	GTCTAGGACACACGACAAAAG	GCATATTGTGACCTGTTTGG	克隆 <i>Zm00001d008173</i>
8174	CTGCATGAGCGTGTACCACT	CCTTGTATTATATGTGGTCCGAA	克隆 <i>Zm00001d008174</i>
8175	GGTATTACAGCGCTTTGTGA	CAGAAGTCAGATTCTCGCCT	克隆 <i>Zm00001d008175</i>

1.5 qRT-PCR 分析

剥取 K932S 和 K932R 单株花药, 1.3~1.7 mm 对应花粉母细胞时期, 1.8~2.2 mm 对应二分体时期, 2.3~2.7 mm 对应四分体时期。利用 Trizol 法提取 RNA^[14], 并参照 PrimeScript 1st Strand cDNA synthesis Kit (Takara) 试剂盒说明书进行 cDNA 的合成。根据克隆得到的基因序列设计引物 ZmbHLH16, 内参选择玉米管家基因 *Actin1* (表 1)。反应体系 (10 μ L): SYBR Premix Taq (2 \times) (Takara) 5 μ L, 正反引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 模板 cDNA (100 ng/L) 0.8 μ L, ddH₂O 3.4 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 S, 58 $^{\circ}$ C 30 S, 40

个循环; 65~95 $^{\circ}$ C 每隔 0.5 $^{\circ}$ C 读板 1 次, 绘制熔解曲线。每个样品设 3 次重复, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 恢复系与同质异核 CMS-C 不育系杂交后代的育性表现

恢复系 K932R 与 2 份同质异核不育系组配的杂交后代 F₁ 均表现为完全可育; F₂ 群体可育株与不育株分离比例经卡方检验均符合 3:1, 说明 K932R 的育性恢复基因由一对显性基因控制 (表 2)。

表 2 CMS-C 不育系与恢复系 K932R 杂交后代育性分离情况

Table 2 Fertility segregation of filial generations of crosses between CMS-C sterile lines and restorer line K932R

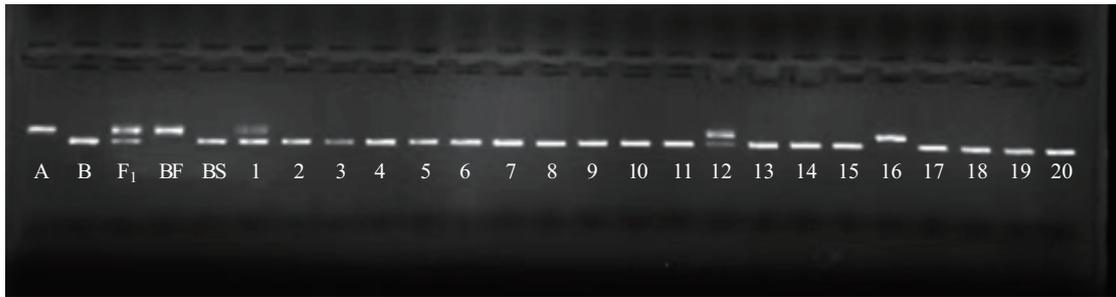
群体 Population	总株数 Total number of plants	可育株数 Number of fertile plants	不育株数 Number of sterile plants	预期比例 Expected ratio (F: S)	χ^2
K169S \times K932R F ₁	120	120	0	0	0
K169S \times K932R F ₂	541	412	129	3:1	0.326
K932S \times K932R F ₁	121	121	0	0	0
K932S \times K932R F ₂	571	433	138	3:1	0.169

$$\chi^2_{(0.05, 1)} = 3.84, \chi^2_{(0.01, 1)} = 6.63$$

2.2 育性恢复基因的初定位

在亲本 K169S 和 K932R 间共筛选到 135 对多态性引物,然后在可育池和不育池间进行筛选,获得 4 对在双亲和混池间均有多态性的 SSR 引物,对 F_2 群体中的 129 株完全不育单株进行基因分

型。结果发现,4 对引物分别检测到 23 个、16 个、14 个和 4 个交换单株,呈依次递减的趋势。图 1 为 K169S \times K932R F_2 群体的部分不育单株在引物 8-21 中的扩增电泳图,其中 1 和 12 号单株发生了单交换,16 号单株发生了双交换。



A: K932R; B: K169S; F₁: K169S \times K932R; BF: 可育混池; BS: 不育混池; 1~20: 不育单株,下同

A: K932R, B: K169S, F₁: K169S \times K932R, BF: fertile mixed pool, BS: sterile mixed pool, 1-20: sterile individuals, the same as below

图 1 多态性引物 8-21 在 F_2 群体部分不育单株中的扩增电泳图

Fig.1 Amplification electropherogram of polymorphic primer 8-21 in some of the sterile individuals of F_2 population

利用 JoinMap 4.0 作图软件,将 K932R 育性恢复基因定位于 8 号染色体短臂,位于 SSR 标记 8-21 与 8-30 之间,遗传距离分别为 2.3 cM 和 7.7 cM (图 2)。该恢复基因暂命名为 *Rf932*。

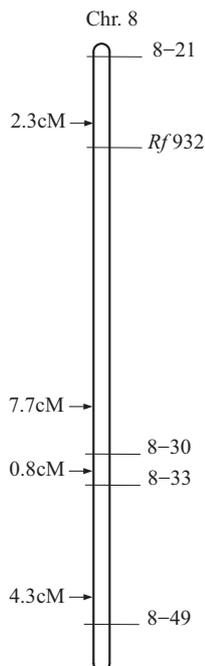


图 2 育性恢复基因 *Rf932* 遗传连锁图

Fig.2 Genetic linkage map of fertility restorer gene *Rf932*

2.3 全基因组重测序数据分析

对 K932S \times K932R F_2 混池及双亲展开重测序,4 个样本分别得到 97408076、95441722、262357196 和 305377452 条 Clean Reads,平均 GC 含量为 46.01%,

Q30 达到 92% 以上。将 Clean Reads 比对到参考基因组 B73_RefGen_v4,平均比对率达到 98.72%,双亲平均测序深度为 12 \times ,BF1 和 BS1 分别为 33 \times 和 39 \times ,说明样品测序正常,可用于后续变异位点检测(表 3)。

根据测序样品比对到参考基因组的结果,双亲共获得 5270087 个 SNPs 和 804407 个 InDels,混池共获得 5710710 个 SNPs 和 887452 个 InDels。对测序数据过滤,最终挑选出 34113 个高质量 SNPs 位点用于关联分析。

2.4 关联分析

根据欧式距离关联分析,获得了位于 8 号染色体 0.61 Mb 的关联区域,包含 21 个基因(图 3a)。 Δ SNP-index 关联分析发现,8 号染色体的 1 个区域在混池间存在明显差异,总长度 0.38 Mb,包含 7 个基因(图 3b)。

对 ED 算法和 Δ SNP-index 得到的结果取交集,获得位于 8 号染色体 211~377169 bp 的关联区域,总长度为 0.38 Mb,候选区域位于初定位区间内,共包含 7 个候选基因(表 4)。

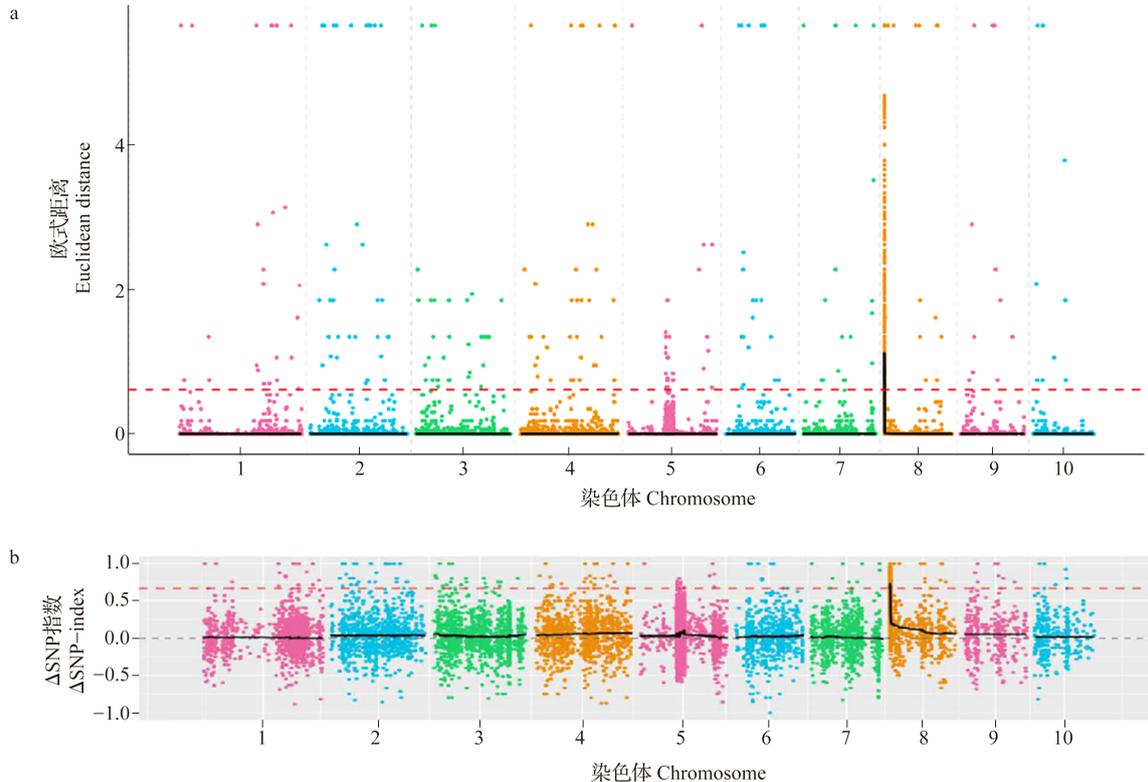
2.5 候选基因同源克隆

在候选区间内选取基因 *Zm00001d008171*、*Zm00001d008172*、*Zm00001d008173*、*Zm00001d008174* 和 *Zm00001d008175* 分别设计交叉引物进行克隆、测序、拼接和比对。结果显示,只有 *Zm00001d008174* 的编码区序列在不育系和恢复系间存在多处核苷酸变异,另 4 个基因除遗传背景外无其他差异,据此确定 *Zm00001d008174* 为目的基因 *Rf932*。与 K932S

表 3 亲本 K932S、K932R 和两个极端池的基因组测序数据统计

Table 3 Summary of the sequencing data for K932S, K932R and two bulks

样品 Sample	过滤读段 Clean_Reads	GC 含量 (%) GC content	质量值 (%) Q30	平均测序深度 Average depth of sequencing	比对率 (%) Mapping rate
K932S	97408076	46.15	92.72	12 ×	98.82
K932R	95441722	45.84	93.16	12 ×	98.47
BF1	262357196	45.98	92.61	33 ×	98.71
BS1	305377452	46.07	92.21	39 ×	98.89



a: 欧式距离分析; b: BSA 法分析 Δ SNP-index; 彩色点为 SNP 位点的欧氏距离或 Δ SNP-index;
黑线为拟合后的欧氏距离或 Δ SNP-index; 红色虚线为显著性关联阈值

a: Euclidean distance analysis, b: The Δ SNP-index is analyzed by the BSA method, the colored dots are the euclidean distance/ Δ SNP-index of the SNP site, the black line is the fitted euclidean distance/ Δ SNP-index, the red dashed line is the threshold of significance association

图 3 可育混池 1 和不育混池 1 的关联分析

Fig.3 Association analysis between BF1 and BS1

表 4 候选区域内的基因及功能注释

Table 4 Genes and annotations in the hot-region

基因名称 Gene ID	功能注释 Annotation
Zm00001d008171	蛋白质磷酸酶
Zm00001d008172	谷胱甘肽 S- 转移酶家族蛋白
Zm00001d008173	过氧化物酶 1 前体
Zm00001d008174	bHLH 转录因子
Zm00001d008175	S- 腺苷甲硫氨酸合酶 1
Zm00001d008176	鳞状启动子结合样蛋白 1
Zm00001d008177	PTI1 酪氨酸蛋白激酶 3

比较, 共有 29 个碱基发生了变异, 恢复系 K932R 中 *Rf 932* 在第 3 外显子第 1565~1568 位点缺失了 4 bp, S1592 处插入了 13 bp, S1622 处插入了 3 bp(图 4)。

Rf 932 编码氨基酸序列比对结果, 由于 K932R 中第 3 外显子核苷酸的插入缺失, 导致 *Rf 932* 编码氨基酸增加 4 个。同时与不育系 K932S 相比, 恢复系 K932R 有 15 处氨基酸变异, 其中 S1614 位点发生了 1 个关键的氨基酸变异 F187Y, 该位点不育系碱基为 TAC, 编码酪氨酸(Y), 而恢复系碱基为 TTT, 编码苯丙氨酸(F)(图 5)。候选基因克隆结果显示, 恢复系 K932R 中的育性恢复基因 *Rf 932* 全

长 2549 bp,由 4 个外显子和 3 个内含子组成,共编码 385 个氨基酸。

2.6 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 分析结果表明,不育系 K932S 和恢复

系 K932R 花药在花粉母细胞时期、二分体时期及四分体时期的相对表达量均无显著差异,说明恢复基因 *Rf 932* 行使育性恢复的功能可能不是通过改变基因表达量来实现的(图 6)。

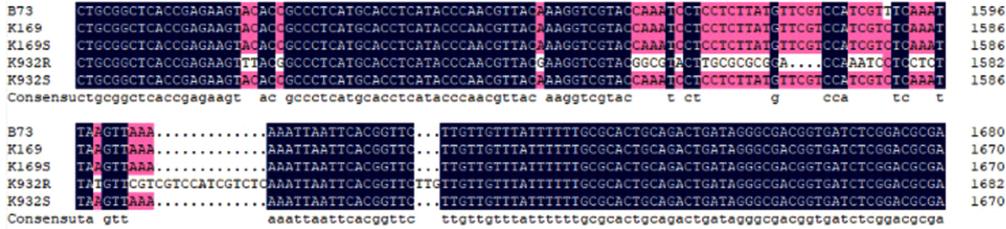


图 4 K169、K169S、K932R 及 K932S 中 *Rf 932* 基因部分序列比对

Fig.4 Some of the sequence alignments of gene *Rf 932* among K169, K169S, K932R and K932S



图 5 *Rf 932* 氨基酸序列比对

Fig.5 Alignment of *Rf 932* amino acid sequence

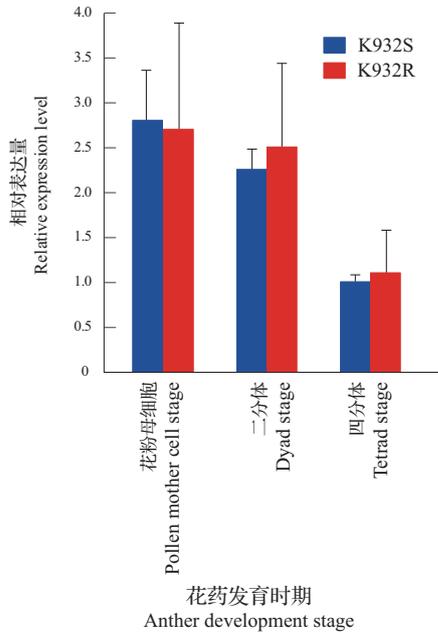


图 6 *Rf 932* 花药不同发育时期的 qRT-PCR 分析
Fig.6 qRT-PCR analysis of *Rf 932* in anthers at different developmental stages

3 讨论

Rf4 是玉米 CMS-C 强效恢复基因,可以恢复 CMS-C 所有亚组的不育系,在杂交制种中具有很大的应用潜力,因此该基因的定位和克隆一直是研究热点。Kohls^[15] 利用 SNP 及 SSR 标记将 *Rf4* 定位于 8 号染色体的 520 kb 区间,包含 12 个基因;牟碧涛等^[16] 利用 SSR 标记及 InDel 标记将 *Rf4* 定位于 8 号染色体的 249 kb 区域,包含 5 个基因;Jennifer 等^[7] 采用 SSR 分子标记、SNP 芯片结合图位克隆,将 *Rf4* 定位于 8 号染色体的 12 kb 区域,包含 2 个候选基因,并利用基因编辑技术证实了区域内 ZmbHLH16 是 *Rf4*,全长 2544 bp,由 4 个外显子和 3 个内含子组成,编码 381 个氨基酸,其中 F187Y 位点由酪氨酸突变为苯丙氨酸,使得 *Rf4* 具有恢复 CMS-C 不育系育性的功能。本研究结合 SSR 分子标记和 BSA-reseq 技术定位了 1 个 CMS-C 育性恢复基因 *Rf 932*,通过 PCR 技术克隆和测序发现,

Rf 932 编码氨基酸比 *Rf4* 增加了 4 个, 其中 F187Y 位点发生了与 *Rf4* 相同的突变, 说明 *Rf 932* 是 1 个新的 *Rf4* 等位基因。另有研究表明, *Rf4* 在某些特定遗传背景中不能发挥育性恢复的功能^[17], 本研究证实了 *Rf 932* 可以恢复 2 个不同核背景的 CMS-C 不育系, 具有较强的恢复力, 对丰富玉米 CMS-C 恢复基因库及推动“三系”配套具有一定的应用价值。

植物中已克隆的大部分恢复基因都属于 PPR 蛋白家族, 依靠 PPR 基元直接或间接地与雄性不育基因转录本或蛋白结合, 影响其转录或蛋白水平, 从而使得植株育性恢复^[18]。刘永明等^[19]研究发现, *ZmbHLLH16* 编码 1 个定位于细胞核的 bHLH16 转录因子, 同时发现 bHLH16 转录因子不属于 PPR 蛋白家族, 不能直接作用于线粒体不育基因, 这与已报道的恢复基因作用机制不同。前人已克隆的恢复基因中, 仅有玉米 *Rf2*^[20]、水稻 *Rf17*^[21] 和 *Rf2*^[22] 以及甜菜 *Rf1*^[23] 不属于 PPR 家族, 但它们编码的蛋白仍然能够靶向线粒体。另有研究报道, *ZmbHLLH16* 同时也是细胞核雄性不育基因 *Ms23*^[24]。*ms23* 突变体由于 *ZmbHLLH16* 基因功能缺失, 绒毡层分化受阻, 最终导致花粉败育^[25-26]。本研究中 CMS-C 突变体 K932S 的败育发生于二分体时期, 花药绒毡层细胞径向膨化并液泡化, 解体推迟, 逐渐充满整个药室^[9]。由于 *Rf 932* 不是通过表达量的改变来行使育性恢复的功能, 因此推测 *Rf 932* 编码 bHLH 转录因子, 在调控绒毡层发育的同时, 可能通过某条途径消除了不育基因的效应, 使得绒毡层结构和功能恢复正常, 从而使植株育性得到恢复。但 *Rf 932* 行使育性恢复功能可能受到其他复杂因素影响, 具体通过哪些途径实现育性的恢复还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨莉芳, 刁现民. 植物细胞核雄性不育基因研究进展. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6): 1108-1117
Yang L F, Diao X M. Progress in plant nuclear male sterility genes. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(6): 1108-1117
- [2] Kheyr-Pour A, Gracen V E, Everett H L. Genetics of fertility restoration in the C-group of cytoplasmic male sterility in maize. Genetics, 1981, 98(2): 379-388
- [3] Quint C, Xu M, Dun D. Cytoplasmic male sterility: identification of the number of the restorer genes. Maize Genetics Cooperation News Letter, 1990, 64(5): 124-133
- [4] Kohls S, Stamp P, Knaak C, Messmer R. QTL involved in the partial restoration of male fertility of C-type cytoplasmic male sterility in maize. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 123(2): 327
- [5] Sisco P H. Duplications complicate genetic mapping of *Rf4*, a restorer gene for CMS-C cytoplasmic male sterility in corn. Crop Science, 1991, 31(5): 1263-1266
- [6] 邵可可. 玉米 C 型胞质雄性不育育性恢复主基因 *Rf4* 的精细定位与图位克隆. 郑州: 河南农业大学, 2011
Shao K K. Fine mapping and map-based cloning of maize C-type cytoplasmic male sterility restoration main gene *Rf4*. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2011
- [7] Jennifer S, Hou Z L, Zheng P Z, Ren R H, Bruce A, Cutter G, Niu X M, Vollbrecht E, Thomas W, Siva P. Fertility restoration of maize CMS-C altered by a single amino acid substitution within the *Rf4* bHLH transcription factor. The Plant Journal, 2020, 101(1): 101-111
- [8] 汤继华, 刘宗华, 陈伟程, 胡彦民, 季洪强, 季良越. 玉米 C 型胞质不育恢复主基因 SSR 标记. 中国农业科学, 2001, 34(6): 592-596
Tang J H, Liu Z H, Chen W C, Hu Y M, Ji H Q, Ji L Y. Maize C-type cytoplasmic sterility restorer main gene SSR marker. Chinese Agricultural Sciences, 2001, 34(6): 592-596
- [9] Zhou G C, Shi H C, Yu X J, Yuan J C, Guo Q, Zhao C Y, Sun Q, Ke Y P. Genetic characterisation and cytological identification of a male sterile mutant in maize. Cereal Research Communications, 2018, 46(2): 344-354
- [10] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88(21): 9828-9832
- [11] Li H, Richard D. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics, 2010(14): 14-20
- [12] Aaron M, Matthew H, Eric B, Andrey S, Kristian C, Andrew K, Kiran G, David A, Gabriel S, Daly M, Mark A. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research, 2010, 20(9): 211-230
- [13] 李盼, 李超, 张瑞茂, 张显强, 罗京. 甘蓝型矮秆直立株型油菜株高性状基因的初步定位. 植物遗传资源学报, 2020, 21(1): 83-93
Li P, Li C, Zhang R M, Zhang X Q, Luo J. Preliminary location of plant height trait genes in *Brassica napus* with dwarf upright plant. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(1): 83-93
- [14] Hummon A B, Lim S R, Difilippantonio M J, Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. BioTechniques, 2007, 42(4): 472-480
- [15] Kohls S. Unraveling genetic factors controlling the restoration of fertility of C-type cytoplasmic male sterility in maize. Business History Review, 2010, 79(3): 453-466
- [16] 牟碧涛, 赵卓凡, 岳灵, 李川, 张钧, 李章波, 申汉, 曹墨菊. 两份玉米 CMS-C 恢复系的育性恢复力测定及恢复基因的分子标记定位. 作物学报, 2019, 45(2): 225-234
Mu B T, Zhao Z F, Yue L, Li C, Zhang J, Li Z B, Shen H, Cao M J. Determination of fertility restoring ability of two maize CMS-C restorer lines and molecular marker location of restorer

- genes. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45 (2): 225-234
- [17] 郑明敏. 玉米 CMS-C 育性恢复的遗传基础研究. 成都: 四川农业大学, 2020
Zheng M M. Analysis on the genetic basis of maize CMS-C fertility restoration. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2020
- [18] Gaborieau L, Brown G G, Mireau H. The propensity of pentatricopeptide repeat genes to evolve into restorers of cytoplasmic male sterility. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1816
- [19] 刘永明, 张玲, 周建瑜, 曹墨菊. 植物细胞核雄性不育相关 bHLH 转录因子研究进展. *遗传*, 2015, 37 (12): 1194-1203
Liu Y M, Zhang L, Zhou J Y, Cao M J. Research progress on bHLH transcription factors related to plant nuclear male sterility. *Heredity*, 2015, 37 (12): 1194-1203
- [20] Feng L, Cui X, Horner H T, Schnable W P S. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell*, 2001, 13 (5): 1063-1078
- [21] Fujii S, Toriyama K. Suppressed expression of RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY restores pollen fertility in cytoplasmic male sterile rice plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106 (23): 9513-9518
- [22] Etsuko I, Natsuko I, Sota F, Tomohiko K, Kinya T. The fertility restorer gene, *Rf2*, for lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein. *The Plant Journal*, 2011, 65 (3): 359-367
- [23] Kazuyoshi K, Takumi A, Muneyuki M, Rika Y, Hiroaki M, Tetsuo M, Tomohiko K. Post-translational mechanisms are associated with fertility restoration of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris*). *The Plant Journal*, 2015, 83 (2): 290-299
- [24] Nan G L, Zhai J X, Arikat 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 (Cambridge, England)*, 2017, 144 (1): 163-172
- [25] Ji C H, Li H Y, Chen L B, Xie M, Wang F P, Chen Y L, Liu Y G. A novel rice bHLH transcription factor, DTD, acts coordinately with TDR in controlling tapetum function and pollen development. *Molecular Plant*, 2013, 6 (5): 1715-1718
- [26] Raj C, Carla Z, Mary R T, Tim W F, Marc C A, Patricia B. Two male-sterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with an extra cell division in the anther wall. *American Journal of Botany*, 2000, 87 (8): 1193-1193