

本科毕业论文（设计）

题 目 玉米核雄性不育突变体基因*Nms1*

的精细定位及候选基因分析

学 院 农学与生物科技学院

专 业 农学

年 级 2012级

学 号 222012326012017

姓 名 高捷

指 导 教 师 刘朝显

成 绩

2016年 5 月 21 日

目 录

[摘要 1](#_Toc13540)

[Abstract 1](#_Toc14328)

[1 文献综述 1](#_Toc26777)

[1.1 植物雄性不育 1](#_Toc15821)

[1.1.1 植物雄性不育的类型 2](#_Toc2776)

[1.1.2 植物雄性不育的分子机理研究进展 3](#_Toc30701)

[1.1.3 玉米细胞核雄性不育材料（GMS）的研究 6](#_Toc17790)

[1.2 图位克隆 7](#_Toc10765)

[1.2.1 图位克隆的基本原理及其理论基础 7](#_Toc12680)

[1.2.2 基因定位常用的分子标记 7](#_Toc25806)

[1.2.3 图位克隆的技术环节 8](#_Toc29258)

[2 引言 10](#_Toc1696)

[3 材料与方法 10](#_Toc15154)

[3.1 实验材料 10](#_Toc4333)

[3.2 试验方法 10](#_Toc7379)

[3.2.1 CTAB法提取玉米叶片基因组总DNA 10](#_Toc23439)

[3.2.2 PCR扩增体系和反应程序 10](#_Toc6919)

[3.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 11](#_Toc16587)

[3.2.4 SSR标记的开发 12](#_Toc23915)

[3.2.5 候选区域基因预测 12](#_Toc28276)

[3.2.6 PCR产物的克隆与测序分析 12](#_Toc5259)

[3.2.7 RNA的提取和cDNA第一链的合成 13](#_Toc11493)

[4 结果与分析 15](#_Toc16742)

[4.1 表型观察与遗传分析 15](#_Toc13033)

[4.2 *Nms1*基因的初定位 15](#_Toc14910)

[4.3 *Nms1*基因的精细定位 17](#_Toc5584)

[4.4 定位区间内基因预测分析 19](#_Toc24278)

[5 讨论 22](#_Toc8001)

[参考文献 22](#_Toc16252)

[致谢 24](#_Toc24200)

玉米核雄性不育突变体基因*Nms1*的精细定位及候选基因分析

高 捷

西南大学农学与生物科技学院，重庆 400715

**摘要：**玉米*Nms1*是用EMS处理B73花粉产生的，与玉米雄性不育相关的突变体。本研究以Mo17为轮回亲本构建了BC1分离群体，对220个单株的小群体的分离情况进行卡方测验，结果表明该突变体是由显性单基因控制。通过群体分离分析法筛选到了与*Nms1*连锁的SSR标记ZAG589，该标记位于玉米第4号染色体的4.10bin。通过扩大群体，利用BC1群体的1864个单株将*Nms1*基因定位在SSR标记AC196708-4和 AC233922-1之间，约350kb的区间。对该区间基因进行预测、功能注释发现仅有7个基因为功能注释基因。通过扩增基因的DNA及cDNA的编码序列与野生型基因进行比较，发现SBP-box基因在第288个氨基酸的位置发生了突变，该位置氨基酸由于碱基突变造成甘氨酸突变为丝氨酸。前人研究报道SBP-box基因在拟南芥中与孢子体的发育相关，因此SBP-box基因的突变极有可能是导致*Nms1*表型产生的原因。

**关键词：**核雄性不育；*Nms1*；精细定位; SBP-box 基因

**Fine Mapping of Nuclear Male Sterile (*Nms1*) in Maize and Candidate Gene Analysis**

GAO Jie

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, PR China

**Abstract:**A male sterile line (*Nms1*) of maize was produced by mutating B73 pollen with chemical agent EMS treatment. We generated BC1 backcross mapping populations by crossing the *Nms1* mutant with Mo17 inbred line. Chi square test was carried out using 220 individual plants of BC1 segregation population, and the result showed that the phenotype of *Nms1* was controlled by a single dominant gene. Through the strategy of bulked segregate analysis(BSA),we found a SSR marker, ZAG589, linked to *Nms1*, was located on the chromosomal region of Bin4.10 on maize genome.The *Nms1* gene was further mapped to an interval about 350 kb between the SSR markers AC196708-4 and AC233922-1 utilizing 1863 BC1 segregating individuals. A candidate gene SBP-box transcription factor, reported to be related to the development of the spore development in *Arabidopsis*, was identified; and was found that the 288th glycine was substituted by serine.

**Key words:** Nuclear male sterile; *Nms1*; Fine mapping; SBP-box gene

**1 文献综述**

**1.1 植物雄性不育**

植物在有性繁殖过程中不能产生正常功能雄配子体的现象，称为雄性不育。雄性不育突变体的发育遗传学分析，对我们深入了解玉米、水稻和拟南芥等花药发育的分子机制具有重要意义。

**1.1.1 植物雄性不育的类型**

植物雄性不育是由多方面原因引起的，按照不同的标准可将雄性不育材料归类到不同的类型中。对雄性不育材料进行分类的做法最初是由Kaul[1]提出的，他将雄性不育材料分为可遗传型和不可遗传型两类。随后，Sears[2]在前人的基础上发展出了“三型学说”，即把雄性不育材料分成核不育、质不育和核质互作不育三种类型。在后人的研究中发现，细胞质导致的雄性不育只是质核互作中引起雄性不育的一个过程，因此将其归类到核质互作的类型中，形成了如今广为人知的“二型学说”[3]，即雄性不育材料包括细胞核雄性不育(genetic male sterility , GMS)和核质互作雄性不育(genic-cytoplasmic male sterility, CMS)两种类型。

①细胞核雄性不育

细胞核雄性不育又称为基因雄性不育，是指单纯的由细胞核基因控制的雄性不育，不受母体细胞质的影响，正反交的遗传效应一致。控制雄性不育性状的基因有显、隐性之分。目前的研究发现，绝大多数的核不育系均由隐性基因控制。雄性核不育材料十分普遍，目前已经在216个常规种和17个种间杂交种中发现了核不育突变体，其中隐性核不育突变约占88%，而显性基因控制的核不育仅占约10%[4]。核不育基因控制的育性表现符合孟德尔遗传规律。

环境与基因互作型雄性不育系由生态环境与基因互作产生，主要有温敏型核雄性不育系。温敏型核雄性不育系也属于核雄性不育，即基因雄性不育。如对温敏型核不育系琼6Qms的研究得出，日最高温度是育性转换的主要因子，表现出低温可育、高温不育。育性转换的温度区间为27～31 ℃。同时， 日照长度对育性转换也有一定的影响，表现为长日照不育、短日照可育。琼6Qms的温光临界期为雄穗的小花分化期[5]。

② 核质互作雄性不育

核质互作型雄性不育又称胞质雄性不育。核质互作雄性不育材料的育性是由细胞核内的核不育基因和细胞质中的细胞质不育基因相互作用控制的，细胞质中的育性基因只能通过母本传递到下一代，因此正反交结果不同，不符合孟德尔的遗传规律，并且只要后代植株的核、质基因组中有一方具有了有正常可育的基因，植株育性便可恢复正常[6]。

根据育性恢复专效性原理，可对核质互作雄性不育进行较为科学的分类。所谓育性恢复专效性，即特定胞质不育基因与其相对应的核恢复基因之间能发生严格的一一对应关系[7，8]。基于此，将核质互作雄性不育分成T、C、S三种胞质不育类型。

**1.1.2 植物雄性不育的分子机理研究进展**

**1.1.2.1 花药的发育过程**

植物花药的发育主要可分为两个时期。第一个时期是花药形态的建成，在这一阶段，花药原基经过几次分化和分裂，从外到里依次形成L1、L2和L3三个胚层，随后L1层通过平周分裂形成一层花药表皮层细胞；L2层是一团充满在表皮层内与L3之间的薄壁组织细胞，其位于花药四个角的表皮层下面的部分是具有浓厚细胞质和显著细胞核的孢原细胞；L3层经过多次平周分裂和垂周分裂最终形成含有维管束的药隔组织。L2层细胞中的孢原细胞继续进行平周分裂产生内、外两层细胞，外面一层细胞叫做初生周缘细胞，里面一层称为造孢细胞，初生周缘细胞分裂形成三层，由外到内分别为药室内壁、中层以及绒毡层，并与最外面的表皮层共同构成成熟花药壁所具有的四层结构。绒毡层包围的结构称为花粉囊，造孢细胞位于花粉囊中。造孢细胞经过多次分裂形成花粉母细胞，这些细胞体积大，原生质浓厚，经过减数分裂，产生四个单倍体的小孢子，小孢子由胼胝质包围，形成四分体结构[9]。

植物花药发育的第二个时期是小孢子发育、配子体发生和花药的开裂。此时的花药逐渐膨大，绒毡层开始降解，并分泌胼胝酶消化小孢子四分体间的胼胝质壁，释放出单个小孢子。随后小孢子经过一次不对称的有丝分裂形成由一个生殖核和一个营养核组成的双核花粉粒，接着小生殖核再进行一次有丝分裂形成最终的成熟三核花粉粒，同时小孢子的细胞膜外形成包括内壁和外壁的花粉壁结构[10]。

花药分化的正常调节是产生有功能花粉的关键，任何花药细胞种类的欠缺或缺陷都会导致雄性不育的发生。

**1.1.2.2 花粉败育的细胞学研究**

花粉败育的发生时期是区分花粉败育途径的关键。一般植物花粉的败育主要发生在造孢细胞增殖到减数分裂期，在这段时期内发生花粉败育的材料又称为无花粉型雄性不育材料，根据花粉的败育特点可分为3种情况[11]。

㈠ 造孢细胞发育异常

造孢细胞不能正常形成的花粉母细胞，而是以无丝分裂的方式不断地增殖，形成许多极不规则的类体细胞，以后逐渐变长，最后变成细丝状而走向解体。到花药发育成熟时，花药囊中已无任何花粉粒物质存在[12]。

在对水稻*MIL*基因突变体进行透射电镜观察中发现，突变体的孢原细胞不能正常的发育，即不能形成正常的造孢细胞及花粉母细胞，随着花药的发育，*mil*突变体的4个药瓣花粉囊的位置充满了薄壁细胞组织[13]。

㈡ 花粉母细胞发育异常

花粉母细胞通过减数分裂形成正常可育的小孢子。减数分裂包括两个连续的分裂过程，分别称为减I期和减II期，它们分别由前期、中期、后期和末期四个时期组成，其中减I前期是减数分裂过程中特有的，也是机理最复杂的一个过程。减I前期又可分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期5个时期，减数分裂过程中最关键的同源染色体联会配对、交叉互换就发生在减I前期。

通常花粉母细胞在减I发生异常，细胞中染色体会有单价体或者染色体片段化出现，导致后期分裂不均匀，产生不可育的小孢子。而若花粉母细胞在减II期出现异常，通常表现为前期小孢子正常发育，而减II中后期染色体发生浓缩，提前降解，或由于细胞板不能正常形成，使得后期小孢子出现“多分体”的现象[14]。

㈢ 绒毡层发育异常

绒毡层细胞最靠近花粉母细胞，花粉母细胞发育所需营养主要来自于绒毡层的供给，若绒毡层发生异常，必然会引起花粉的发育异常[15]。

有研究表明，绒毡层异常导致花粉小孢子败育的原因主要是由于绒毡层细胞程序性死亡(Programmed Cell Death，PCD)异常造成的，绒毡层细胞提前或推迟降解，进而影响花粉小孢子的正常发育，最终形成雄性不育[16]。戴文懿等[17]发现，在拟南芥的温敏雄性不育突变体*atms1*中，高温环境使花药绒毡层PCD进程出现滞后，直到花粉粒发育后期仍无法正常降解，使其不能产生正常的花粉粒，从而影响了植株的育性。除PCD进程异常的原因以外，花粉小孢子败育也可能由于绒毡层细胞本身发育过程中出现异常造成的。甘蓝不育系CMS158在花粉母细胞四分体时期绒毡层细胞径向膨大，其细胞内含物极少，营养无法满足自身发育需要，反而通过径向伸长以吸取小孢子四分体中的营养，导致小孢子营养流失，不能正常生长发育而形成败育[18]。而施展等[19]认为，大白菜不育系6W-9605A的败育原因是绒毡层细胞异常膨大，挤压小孢子，导致小孢子和绒毡层解体。

综上所述，当绒毡层细胞出现PCD异常或者发育异常时，其无法正常向小孢子提供发育所需的营养物质，甚至占据了小孢子发育所需的空间，最终导致了花粉败育的发生。

**1.1.2.3 雄性不育的分子机理研究**

㈠ 花粉母细胞减数分裂相关基因

植物花粉母细胞的减数分裂是花药发育的重要过程之一，在花粉母细胞生成小孢子过程中，如果与减数分裂相关的基因发生突变，通常会造成植株的雄性不育。目前已在水稻、拟南芥等模式作物上鉴定克隆了一批与花粉母细胞减数分裂相关的基因[20]。

拟南芥中发现的*ASY1* [21]与水稻上的*PAIR2* [22]是同源基因，与花粉母细胞减数分裂过程中同源染色体的配对联会相关。在突变体花药中，花粉母细胞联会过程发生异常，在减I期中同源染色体之间不发生联会，导致后期细胞中形成了单价体，影响植株的育性。而在拟南芥中克隆到的减数分裂相关基因*MMD1*[23]是一个转录因子，其突变体的花粉母细胞在染色体终变期前是正常的，但到了减数分裂后期，花粉母细胞的胞质开始浓缩，染色质出现断裂，最终导致胞质无法分裂，同时花粉母细胞开始死亡。

花粉母细胞的减数分裂是一个涉及许多基因调控的复杂的过程，只有所有相关的基因正常调控，才能促使花粉母细胞减数分裂的正常进行，最终形成成熟可育的花器官。

㈡ 绒毡层发育相关基因

近年来，随着分子生物学的发展，在拟南芥和水稻等模式作物中鉴定克隆了一些与绒毡层发育相关的基因。有研究发现，*AG*（*Agamous*）作为绒毡层发育早期的调控因子之一，位于*SPL/NZZ*（*Sporoyteless/Nozzle*）基因的上游，并通过激活*SPL/NZZ*基因的表达，共同调控花药的发育；而*SPL/NZZ*基因编码MADS-box转录因子家族的一个核蛋白，其功能与孢原细胞分化形成初生周缘细胞和初生造孢细胞的过程有关，突变体*spl/nzz*中的孢原细胞可以形成，但随后的细胞分裂会出现缺陷，导致绒毡层和造孢细胞缺失，从而造成雄性不育[24]。

拟南芥中的*AMS*基因与水稻中的 *TDR* (*TAPETUM DEGENERATION RETARDATION*)基因同源，编码了一个*MYC*类的转录因子，主要在花粉母细胞减数分裂后期的绒毡层细胞中表达，突变体表现为绒毡层细胞肥大、降解推迟，进而导致花粉败育[25]。

㈢ 花粉壁发育相关基因

植物花粉壁是包裹在花粉小孢子外面的一层致密物质，由以孢粉素为主的外壁和以多糖成分为主的内壁组成。孢粉素具有耐高温，抗氧化和耐强酸、强碱的特性，是维持花粉粒形态结构的重要成分。外壁由表及里又分为覆盖层、柱状层、基层、外壁内层共四层不同功能的花粉外壁结构，而内壁在结构上相对简单，其主要功能与花粉粒的物质积累有关[26]。

在花粉小孢子的发育阶段，花粉壁是保证小孢子正常发育的基础，没有花粉壁的小孢子会导致内含物质的渗漏，从而引起小孢子的败育[27]。目前在拟南芥中已发现了许多花粉壁发育相关基因，如*DEX1*，其突变体在小孢子四分体时无法正常形成网纹状的初生外壁，使得在小孢子发育期间孢粉素无法准确定位到外壁上，只能随机附着在小孢子的细胞膜上，由于外壁结构上的缺陷，*dex1*突变体小孢子最终降解[28]。

此外，拟南芥中的*CalS5* (*Callose Synthase 5*）[29]、*NEF1* (*no exine formation 1*)[30]等基因也与花粉外壁发育相关，而*MS33*则是与拟南芥花粉内壁形成及物质积累相关的基因，主要控制包裹着内壁的脂类物质和蛋白类物质的正常发育[31]。

**1.1.3 玉米细胞核雄性不育材料（GMS）的研究**

玉米在花药发育和减数分裂研究中具有很强的优势：玉米的每一个穗上都有数以百计的仅有雄蕊的小花，并且花药发育非常规律；在每一个小花中的三个花药发育是高度同步的[32]，减数分裂也是同时发生的[33]；且玉米花药较大，可直接解剖得到足够的生化物质作为研究材料。

**1.1.3.1 玉米GMS材料的细胞学研究**

对玉米细胞核雄性不育的研究已经有将近一个世纪的历史，随着科学技术发展和仪器设备不断升级，玉米细胞核雄性不育材料的花粉败育细胞学机理已经被研究的比较透彻。

P.C.Cheng等在光学显微镜和扫描电子显微镜下对玉米ms10雄性不育材料的小孢子发育过程进行观察，发现在小孢子发育早期绒毡层细胞异常液泡化，细胞质发生降解，导致在小孢子发育中期出现败育[34]。李竞雄等发现，部分GMS材料的花药在减数分裂期至四分体时期开始出现发育异常，具体表现为花药细胞内细胞器结构被破坏，胞质稀薄并出现大量异常液泡；在单核花粉期，绒毡层细胞中内含物稀少，无正常乌氏体生成，降解后，绒毡层细胞的营养物质无法提供给小孢子，最终导致小孢子败育[35]。

**1.1.3.2 玉米GMS材料的分子学研究**

1930年，Singleton和Jones发现首例核不育基因，并定名为ms1，它位于玉米第6号染色体的长臂上，属隐性基因。随后，其他学者又相继发现了许多新的ms (male sterility)基因。到目前为止，发现并已命名的ms系列玉米细胞核不育基因约50个，而已定位的有42个，其中Ms41、Ms42和Ms44属显性基因，其余为隐性基因[36]。ms30是我国科学家李竞雄首先发现的，将其定位到4号染色体上；梁业红等随后又对ms30进行了精细定位，验证了前人的研究结果[37]。有研究发现，ms45编码的一种蛋白与异胡豆苷合酶功能相似，该生化酶参与生物碱的生物合成，在减数分裂后期具有重要作用[38]。

**1.2 图位克隆**

**1.2.1 图位克隆的基本原理及其理论基础**

图位克隆又称定位克隆，首先由剑桥大学的Alan coulson[39]提出来的。它是一种以正向遗传途径分离目的基因的方法[40]，即在不知道目的基因DNA序列信息和编码产物的情况下，从特定性状变化的个体中找到能解释该性状变化的基因，并揭示其功能。图位克隆的基本原理是利用交换单株通过筛选与目标基因紧密连锁的分子标记将目标基因进行精细定位，基因预测确定候选基因后进行遗传转化，从而揭示基因功能。

图为克隆的遗传学理论基础是：⑴ 细胞在减数分裂时，同源染色体上连锁基因会发生交换和重组；⑵ 分子标记与目标基因间交换频率随其物理距离的增加而增大。因此，在图位克隆中构建定位群体就是筛选发生重组交换的单株，结合分子标记鉴定的重组单株的基因型和表型确定标记与目的基因的相对位置关系，最终筛选到与目的基因共分离的分子标记。

**1.2.2 基因定位常用的分子标记**

在植物中常用的标记有形态标记、细胞学标记、生化标记和分子标记四种类型。分子标记与前三类相比具有许多优越性，例如标记数量多，分布整个基因组；使用可操作性强，不受环境、季节条件的限制；有许多标记是共显性遗传，可区别纯合体和杂合体。

简单序列重复标记分子标记（Simple Sequence Repeat, SSR)，又称微卫星DNA，是图位克隆中一种常用的共显性分子标记。它是由2~5个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列，分布于整个基因组的不同位置上，每个座位重复单位的数量可能不完全相同，因而形成多态性。由于SSR两侧DNA顺序高度保守，可利用SSR两侧保守序列设计一对特异引物，扩增该位点微卫星DNA序列，经聚丙烯酰胺电泳即可显示不同基因个体在这个SSR位点上的多态性。SSR标记具有以下特点：数量较为丰富， 覆盖整个染色体组； 具有多等位特性，信息量高；以孟德尔方式遗传，呈共显性；所利用的位点保守性高，因而可靠性高，重复性好；操作简单，速度快，非常适合于BSA法基因标记定位。缺点是必须知道SSR序列两端的保守序列，用来合成引物，开发和使用费用较高，较难满足BSA进行大量引物筛选的要求，这些使得SSR标记在基因定位方面的应用也受到很大限制[41]。

除SSR分子标记外，图位克隆中还常使用的共显性标记有酶切扩增多态性序列标记（CAPS）、dCAPS标记、插入缺失多态性标记等[42]。

**1.2.3 图位克隆的技术环节**

在利用图位克隆分离目的基因的过程中，主要有以下几个技术环节：定位群体的构建、初定位、精细定位、候选基因的确定和候选基因的功能验证。

⑴ 定位群体的构建

① 亲本的选择

选择遗传差异大、DNA多态性丰富的亲本构建定位群体是实现基因精细定位的重要前提。亲本间丰富的遗传变异有利于我们开发更多的在双亲间具有多态性的分子标记，从而实现对基因的精细定位。因此在构建定位群体前，通过利用全基因组的引物对多个拟组配群体的亲本进行多态性鉴定，统计不同亲本间多态性引物对数，选择多态性引物多的亲本进行定位群体的组配。

② 定位群体的组配

根据性状表型组配分离群体。根据定位群体的遗传稳定性可分为临时性定位群体和永久性定位群体。临时性定位群体有BC1群体、F2群体，常用于单基因控制的质量性状基因的定位。若目标基因所控制的表型性状为隐形，可用BC1或F2群体，F2群体提供的交换重组信息量更丰富；若目标基因所控制的表型性状为显性，则只能用BC1群体。而近等基因系、重组自交系等，系间基因型存在差异，系内个体间基因型相同、自交后代不分离[43]的群体，属于永久性定位群体，一般用于数量性状定位，其缺点是群体构建费时费力。

⑵ 初定位

在初定位过程中首先要筛选与目标基因连锁的分子标记，然后将目标基因成功定位在两分子标记之间。

① 筛选与目标基因连锁的分子标记

集团分离分析法是一种用于快速筛选与目标基因连锁的分子标记的一种方法。其原理是在一对有目标性状差异的亲本所构建的分离群体中，根据目标性状差异把群体分为两类，在这两类群体中除了目标基因片段以及与目标基因紧密连锁的片段不同外，其他染色体片段的遗传组成理论上是完全相同的。具体操作方法为：根据目标性状的差异，把分离群体的植株分为两类每类分别取10~20株提取DNA，每株DNA等量混合，形成两个基因池，这两个基因池除了目标位点及附近有差异外，其它部分理论上完全相同。用多态性分子标记筛选两个基因池，在两个基因池间表现多态性的分子标记极有可能与分子标记连锁[41]。

② 将目标基因定位于两连锁标记之间

筛选到与目标基因连锁的分子标记后，确定分子标记在基因组中的物理位置，然后在连锁标记的上下游继续开发引物，筛选在两亲本间有多态性的引物。用这些多态性引物对分离群体各单株的基因型进行鉴定，结合表型筛选出交换单株，根据这些交换单株在上下游标记的交换情况将目标基因定位到两个分子标记之间。

⑶ 精细定位

在将目标基因定位在基因组上特定区域后，就要开发、筛选更多的多态性标记，筛选更大的分离群体，直到找到与目标基因紧密连锁共分离的分子标记。精细定位是图位克隆的限速步骤，耗时耗力[44]。具体操作流程是：扩大定位群体（BC2），用初定位分子标记筛选更多的交换单株，结合表型确定重组的染色体片段与目标基因的上下游关系；在初定位染色体区域内开发更多的多态性SSR标记、CAPS标记等，对各交换单株的基因型进行进一步鉴定，继续筛选交换单株，不断缩小定位区间范围，并进行基因预测，确定候选基因。

⑷ 候选基因的确定

确定候选基因有如下几种方法：

① 比较两亲本间候选基因序列，筛选功能突变位点。基因功能的突变可能由保守功能结构域位点上碱基发生点突变或在序列中有大片段的插入、缺失，或由于基因表达的调控元件发生突变从而使基因的表达产物或表达模式发生变化，进而影响基因功能，导致突变表型的产生。

② 比较分析候选基因的cDNA序列在两亲本间的差异，通过定量或半定量分析验证候选基因的时空表达模式与突变体目标性状的表现是否相同。若两亲本的候选基因的cDNA序列上有插入、缺失、碱基替代或cDNA在时空表达模式上发生变化，并与突变体目标性状相符，则在一定程度上可证明该基因为候选基因。

③ 对不同品系或自交系中的候选基因进行测序，验证功能位点。比较不同品系或自交系间候选基因测序结果，若野生型材料在该位点均区别于突变体，则可确定该基因为候选基因。

⑸ 候选基因的功能验证

构建候选基因的表达载体，进行遗传转化，观察转基因后代的表型，这也是最直接、最根本的验证候选基因的方法。

**2 引言**

目前，从表型得到的未知的雄性不育突变体有数百个之多，尽管资源丰富，但仅有一小部分的雄性不育突变体在细胞学水平上得到研究，而已被克隆的基因就更少了，其中多数还是由隐性基因控制的。本实验研究的*Nms1*突变体则是由显性单基因控制的细胞核雄性不育突变体, 目前尚无克隆该类基因的研究报道，因此克隆该基因在研究花药发育及雄性不育机理等方面具有重要价值。

**3 材料与方法**

**3.1 实验材料**

突变型亲本（父本）：用EMS处理过的B73

野生型亲本（母本）：Mo17

两亲本杂交得F1代，取F1代中的雄性不育植株，用Mo17与之回交，得BC1分离群体作为定位群体。

**3.2 试验方法**

**3.2.1 CTAB法提取玉米叶片基因组总DNA**

①向CTAB提取液中加入1%~2%（v/v）的ß-巯基乙醇，65°C水浴预热。

② 取玉米新鲜叶片，大约2-4克，装入两毫升离心管中，用液氮研磨至粉末状，粉末体积占离心管1/4左右。

③ 加入750μL预热的CTAB提取液，65°C水浴45min，每隔10min轻轻颠倒几次。

④ 从水浴锅中取出，冷却至室温，加入24：1的氯仿/异戊醇750μL，轻轻上下摇动离心管，直到离心管底部液体呈墨绿色。

⑤ 12000rpm室温下离心10min，小心将上清液转移至1.5ml离心管中，加入预冷过的异丙醇500μL，轻微颠倒出现絮状沉淀后静置。

⑥ 12000rpm室温下离心5min，小心倒掉上清液，避免贴附在管底的DNA松动。加入500μL75%酒精洗涤DNA1-2次，倾出酒精，放干净的吸水纸上晾干。

⑦ 加入400μL的1×TE（pH=8.0），溶解DNA备用。

**3.2.2 PCR扩增体系和反应程序**

引物溶解：将上下游粉末状引物12000rpm离心1min，加入1×TE（pH=8.0）400μL，涡旋，使充分溶解后，将上下游引物吸入一个离心管中，再涡旋充分混匀，备用。

PCR反应体系：

DNA template (20-50ng) 1.5μL

Primer 1.5μL

Taq酶 0.2μL

dNTPs (2mM) 0.5μL

10×buffer 2μL

ddH2O 14.3μL

Totle 20μL

PCR反应程序： 94°C 5min

94°C 30s

58°C 30s 35 cycles

72°C 30s

72°C 5min

25°C 2min

反应完毕后放置于4°C冰箱中保存。

**3.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳**

1. 胶的制备：

⑴ 取两块用蒸馏水清洗、擦干的制胶玻璃板，将有磨砂边的玻璃面朝里形成夹层，用封边条将它们固定。

⑵ 用1%的琼脂糖封堵住缝隙，防止漏液。

⑶ 带琼脂凝固后，将胶床装入电泳槽中，固定好。

⑷ 取6%的PA胶（聚丙烯酰胺凝胶）40mL，10% AP 300μL，25μL的TEMED混匀。

⑸ 将制好的PAGE溶液迅速注入胶床中。灌胶时要避免小气泡出现。

⑹ 小心插入干净的梳子，让梳子的齿和大玻璃板边缘平整的贴合在一起。

⑺ 将电泳槽放置水平，静置约1h待凝胶聚合完成后再电泳。

1. 电泳

⑴ 向PCR产物中加入2μL的2×Loading buffer(0.25%溴酚蓝，0.25%二甲苯青，40%蔗糖水溶液)，混匀。

⑵ 取出梳子，分别加入正负极缓冲液（1×TBE）。

⑶ 用移液枪吸取1.3μL混合液加入梳齿孔中，注意枪头不要刺破凝胶，加样时不要产生气泡。

⑷ 接上正负极，电泳约40min。

1. 银染和显影

⑴ 将凝胶放入0.2%AgNO3溶液中，置于摇床上摇荡10min。

⑵ 取出后用蒸馏水洗涤1~2次。

⑶ 将胶块放入显色液（去离子水1L，NaOH 15g，甲醛5mL）中，置于摇床上摇荡，直至显现出清晰的DNA条带。

⑷ 用清水冲洗3次后，取出凝胶放在灯箱上观察条带，并拍照。

**3.2.4 SSR标记的开发**

SSR的发掘主要利用SSRHunter1.3软件，具体操作如下：

① 从http://www.maizesequence.org下载目标区段基因组序列，存为faste 格式文件。

② 将fasta格式的DNA序列输入SSRHunter软件，选择参数，将“构成重复元件的核苷酸数最多是”设为“6”，将“重复次数最少为”设置成“4”。

③ 点击搜索按钮，软件执行SSR序列搜索任务，导出所有的微卫星重复及其两侧各延伸150bp的基因组序列，将结果复制粘贴到word文档中。

④ 利用NCBI对所有的SSR序列进行Blastn，在玉米基因组序列数据库（高通量基因组序列，HTGS）中筛选单拷贝的SSR序列。选择单拷贝序列进行下一步引物设计。

⑤ 利用NCBI中的primer designing tool设计引物，引物位于重复序列的上下游，且为单拷贝，扩增产物长度200bp左右，引物GC含量20~60%，50%最好，Max Tm difference为1，primer size为15~25个碱基，一般为22个碱基。

**3.2.5 候选区域基因预测**

以B73基因组（www.maizesequence.org）为参考，将候选区域的核苷酸序列下载下来后，利用基因分析与预测软件（www.softberry.com）,采用在线软件对候选区域进行基因预测，即将DNA序列转化成蛋白质序列。再利用NCBI中的Blastp将蛋白质序列在蛋白质库中进行比对，得到相应蛋白名称。查看相关文献了解相应蛋白功能，预测候选基因。

**3.2.6 PCR产物的克隆与测序分析**

⑴ 配制LB培养基

酵母提取物5g/L，胰蛋白胨10g/L，NaCI 10g/L。调pH值为7后，定容高压121°C、25min灭菌。 固体培养基还要加入15g/L琼脂粉，灭菌后倒板前加入卡那霉素母液（每100mL的LB培养基加入100μL的Kan），摇匀后倒入无菌培养皿中制板，在无菌操作台上风干后倒置放入4°C冰箱中保存。

⑵ 连接

连接体系：pEASY-T1 Cloning Vector 1μL，加入PCR产物 3μL

于冰上轻轻混合，室温25°C反应15min，反应结束后将离心管置于冰上。

⑶ 转化

① 在冰上解冻感受态细胞（50μL），在刚解冻时加入连接产物轻弹混匀，动作要柔缓避免吸打菌液，此操作在无菌操作台上完成，冰浴20~30min。

② 42°C热激45s，立即置于冰上2min。

③ 加入300μL的LB培养液，置于37°C恒温摇床，200rpm，复苏培养1h。

④ 取150μL菌液涂布于含Kan的LB固体培养基上，操作在无菌操作台上完成。

⑤ 倒置平板于37°C培养箱中培养过夜（14h以上）。

⑷ 克隆与测序

① 挑斑：挑单独的克隆至加入了400μL的LB培养液（含Kan）的已灭过菌的离心管中，该过程注意无菌操作。

② 置于37°C摇床上，250rpm培养3h以上至菌液混浊。

③ 菌液检测：吸取菌液2μL作为模板DNA，反应体系共20μL，其他成分同上。

PCR反应条件：94°C预变性10min（裂解细胞，失活核酸酶），94°C变性30s，60°C退火30s，72°C延伸（根据片段大小确定延伸时间）,35个循环，72°C充分延伸5min。

琼脂糖凝胶电泳（180V恒压）约15min，确认重组阳性克隆。

④ 选阳性克隆菌液送英骏公司测序。

**3.2.7 RNA的提取和cDNA第一链的合成**

试剂盒采购自TIANGEN。

⑴ RNA提取前准备

① 经常更换新手套，避免导致RNase污染。

② 使用无RNase的塑料制品、枪头、研钵和玻璃器皿、镊子。研钵、玻璃器皿和镊子可在150°C烘烤4~5h去除RNase。

③ 配制溶液应使用RNase-Free ddH2O。

⑵ 玉米总RNA提取

① 取野生型和突变型玉米的幼叶、根、茎、雄雌穗，在液氮中研磨至细粉，加入450μL RL，涡旋剧烈振荡混匀；

② 将所有溶液转移至过滤柱CS上（过滤柱放在收集管中），12000rpm离心2-5min，小心吸取收集管中的上清至RNase-Free的离心管中；

③ 缓慢加入0.5倍上清体积的无水乙醇，混匀，将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，12000rpm离心1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中；

④ 向吸附柱CR3中加入350μL去蛋白液RW1，12000rpm离心1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中；

⑤ DNase l工作液的配制：取10μL的DNase l储存液放入新的RNase-Free的离心管中，加入70μL RDD溶液，轻柔混匀。

⑥ 向吸附柱CR3中央加入80μL的DNase l工作液，室温放置15min；

⑦ 向吸附柱CR3中加入350μL去蛋白液RW1，12000rpm离心1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中；

⑧ 向吸附柱CR3中加入500μL漂洗液RW，室温静置2min，12000rpm离心1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CR3放回收集管中，重复步骤8；

⑨ 12000rpm离心2min，倒掉废液，将吸附柱CR3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液；

⑩ 将吸附柱CR3放入一个新的RNase-Free的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100μL RNase-Free ddH2O，室温放置2min，12000rpm离心2min，得到RNA溶液。

RNA样品放置于-70°C中保存。

⑶ 引物模版混合液配制

RNA 4μL（2μg）、oligodT 2μL、RNase-Free water补足至10μL，70°C孵育5min。

⑷ cDNA第一链合成

将步骤⑶中的离心管置于冰上冰浴，稍微离心后加入下面的反应混合液：

5×M-MLV Buffer 4μL

dNTP 4μL

MMLV-RTase 1μL

RNasin 1μL

42°C水浴1h，然后72°C 5min灭活，放置于-20°C冰箱中备用。

**4 结果与分析**

**4.1 表型观察与遗传分析**

突变株在花粉期不散粉，花药较野生型小，瘪、不饱满，色偏白（图4.1）。两亲本杂交得到的F1代中出现雄性不育突变表型，说明该突变是显性突变；在回交BC1群体中，共220株植株，其中不育株113株，可育株107株，通过卡方检测：

Χ2=≈0.16 （4-1）

自由度df=2-1=1 查表得P>0.05，差异不显著，分离比符合1：1，由此可得该突变表型由显性单基因控制。

****

**图4.1*****Nms1*突变体表型观察**

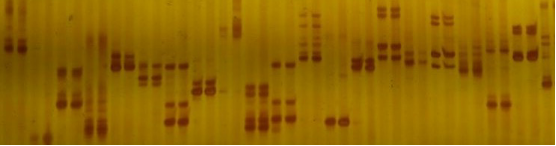
**WT：野生型 MT：*Nms1*突变体**

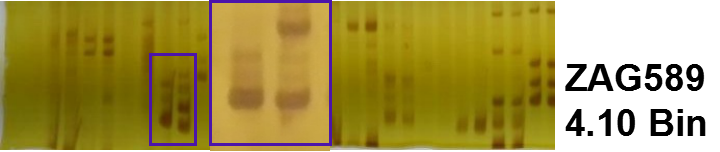
**Fig.4.1 Phenotype observation of *Nms1* mutant**

**WT: wild type MT: *Nms1* mutant**

**4.2 *Nms1*基因的初定位**

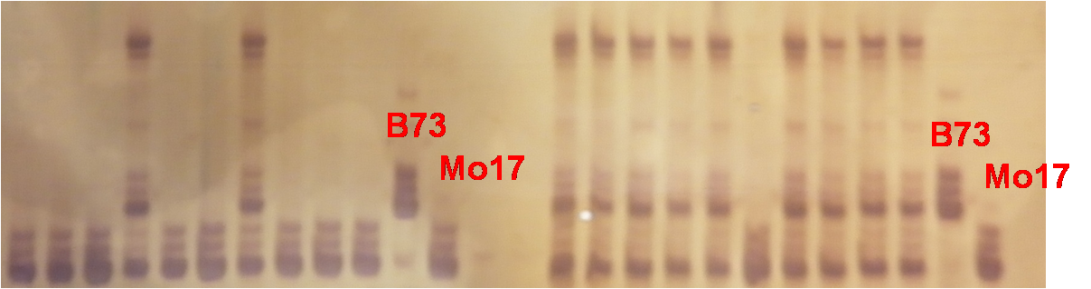
本实验利用BSA法筛选连锁标记，初定位所利用的群体为BC1分离群体。我们从田间选取了不育和可育植株各10株，提取DNA等量混合，构建了“不育池”和“可育池”两个基因池。在maizeGDB中查找玉米全基因组的SSR引物，筛选出前人研究拟在B73、Mo17之间有多态性的引物约700对，送生工合成。用这些引物对两亲本（B73和Mo17）以及“不育池”、“可育池”进行扩增，寻找多态性引物，筛选连锁标记（图4.2）。在亲本和基因池间均有多态性的引物即为与目标基因连锁的标记。最终我们找到ZAG589这个标记在亲本和基因池间都具有多态性（“可育池”为单带，“不育池”为杂合带）。用ZAG589分别扩增构成两个基因池的各单株基因，进行单株检测（图4.3），进一步验证ZAG589就是与目标基因连锁的标记。ZAG589位于玉米基因组4号染色体4.10 bin上，所在contigAC217362.3-contig16位于237.25Mb处。进一步在4号染色体上ZAG589标记附近设计、筛选在B73、Mo17以及基因池间具有多态性的SSR标记。又找到3个与目标基因连锁的多态性SSR标记：AC196269SSR-3（237.7Mb）、AC204715SSR-3(238.77Mb)、AC191360SSR-3（239Mb）。





**图4.2** ***NmsI*连锁标记的筛选**

**Fig.4.2 Screening linkage markers of *NmsI***



**图4.3** **ZAG589的单株检测结果**

**Fig.4.3 Genotype identification using SSR marker ZAG589**

用这4对连锁标记扩增220个BC1分离群体，利用基因的连锁交换规律及三点检测确定标记与目标基因的相对位置。通过基因型与表型的分析发现，SSR标记ZAG589和AC196269SSR-3位于基因的同一侧，目标基因与ZAG589和AC196269SSR-3之间发生交换的单株数依次为10株和7株；标记AC204715SSR-3和AC191360SSR-3在基因另一侧，目标基因与AC204715SSR-3和AC191360SSR-3间交换单株数依次为3株和4株。由于交换频率随物理距离的增大而增大，因此可确定目标基因Nms1在AC196269SSR-3和AC204715SSR-3两标记之间，物理距离约为1.07Mb（图4.4）。



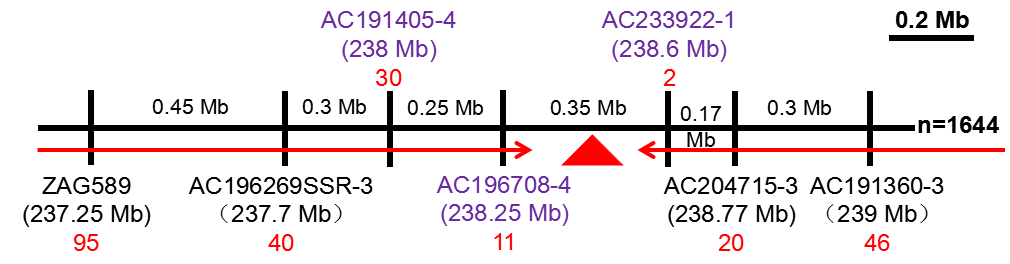
**图4.4** ***NmsI*的初定位**

**Fig.4.4 Initial mapping of *NmsI***

**4.3 *Nms1*基因的精细定位**

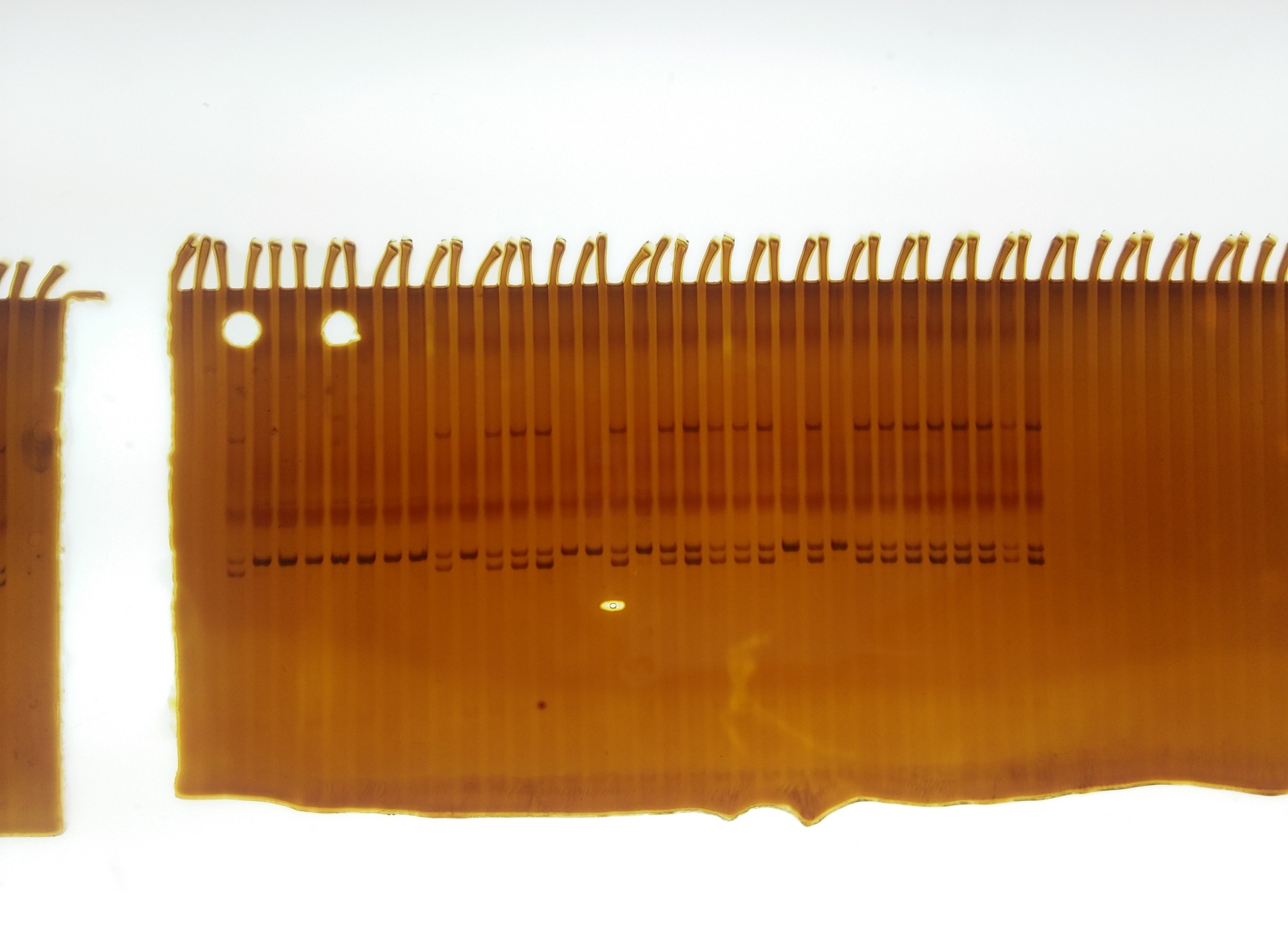
在初定位的基础上，为进一步缩小定位区间，实现对*Nms1*基因的精确定位，我们在AC196269SSR-3和AC204715SSR-3两标记之间再开发SSR标记，共找到三个多态性标记：AC191405SSR-4(238Mb)、AC196708SSR-4(238.25Mb)、AC233922SSR-1(238.6Mb)。初定位剩余的10个交换单株用新开发的标记检测，结果表明标记AC191405SSR-4和AC196269SSR-3在目标基因的同一侧，与目标基因间有3个交换单株，而其余标记均无交换单株。

用Mo17作为轮回亲本回交扩大分离群体用于精细定位，共得到1644株。用初定位的4个多态性连锁标记和新开发的3个多态性SSR标记对该分离群体进行扩增分析，统计基因型并结合表型，发现标记ZAG589、AC196269SSR-3、AC191405SSR-4和AC196708SSR-4在目标基因的同一侧，交换单株数依次为95、40、30和11株；标记AC191360SSR-3、AC204715SSR-3和AC233922SSR-1在目标基因的另一侧，交换单株数依次为46、20和2株。因此目标基因被定位在了标记AC196708SSR-4和AC233922SSR-1之间，两标记之间的物理距离为0.35Mb（图4.5）。部分标记扩增结果见图4.6，标记引物序列见表4.1。

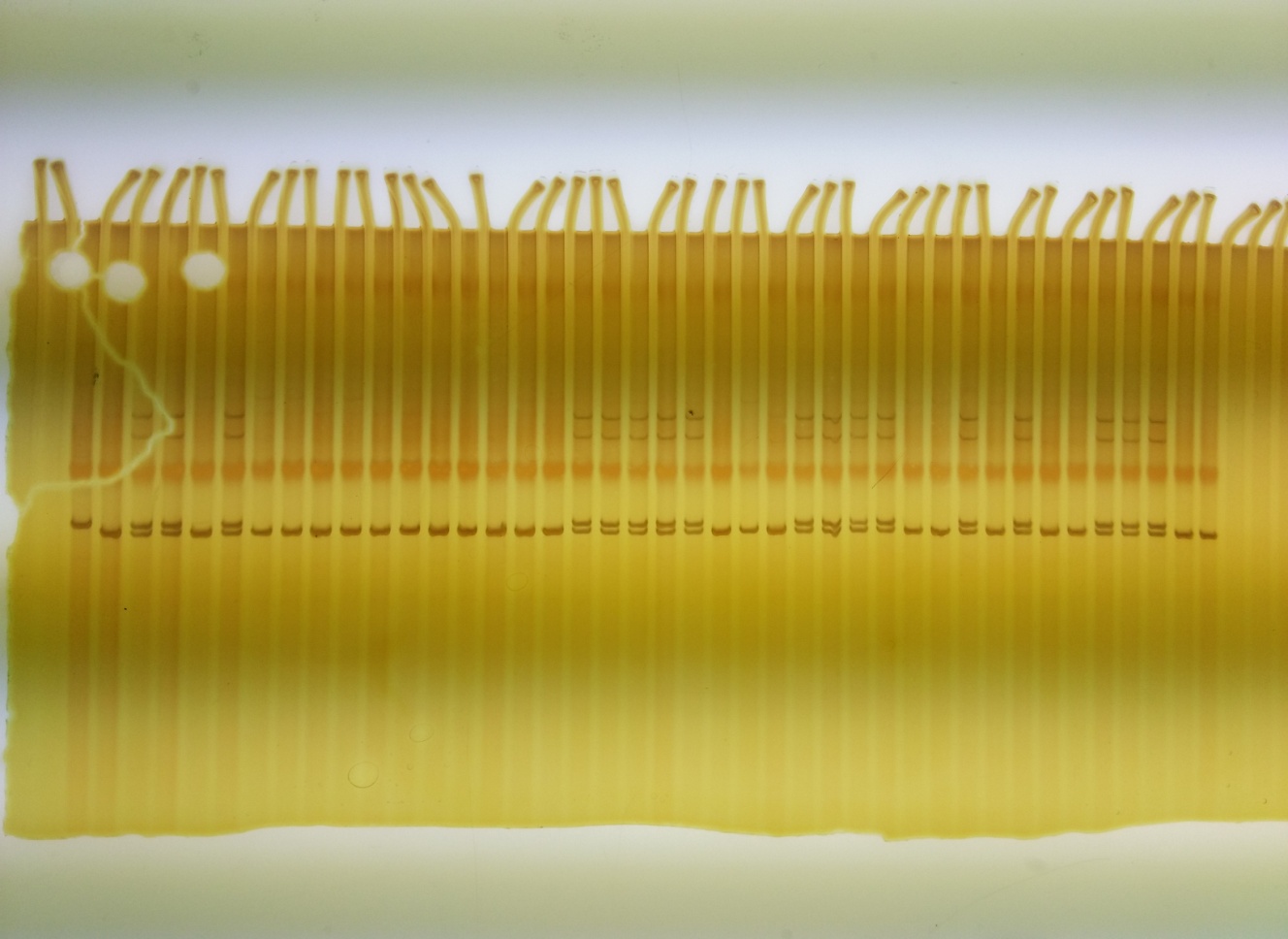
****

**图4.5 *Nms1*的精细定位**

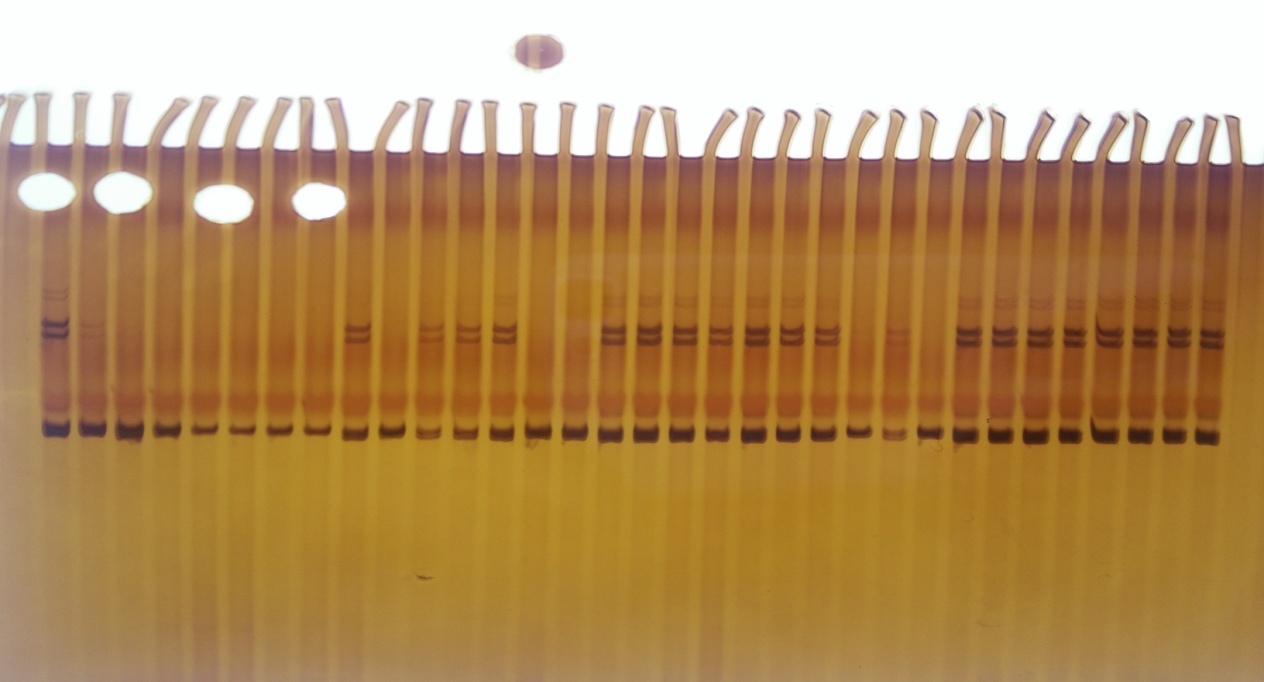
**Fig.4.5 Fine mapping of *Nms1***



**AC196269SSR-3**



**AC204715SSR-3**



**AC191405SSR-4**

**图4.6精细定位标记扩增分离群体筛选交换单株电泳图**

**Fig.4.6 Genotype identify of recombinants with SSR markers for *Nms1* fine mapping**

**表4.1 *Nms1*基因定位分子标记引物序列**

**Table 4.1 The sequences of SSR markers for *Nms1* fine mapping**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 标记类型 | 标记名称 | 引物序列（5’to 3’） | 扩增长度 |
| SSR | ZAG589 | GGGTCGTTTAGGGAGGCACCTTTGGT | 167bp |
|  |  | GCGACAGACAGACAGACAAGCGCATTGT |  |
|  | AC196269SSR-3 | ACTACAGAGTACAGACACGCTG | 177bp |
|  |  | CAAGTCCGTCAAGTATGCCTTC |  |
|  | AC191405SSR-4 | ACCGAATGCACATCTTCGTACT | 208bp |
|  |  | CTGGCCATTATGTTTGACGCTT |  |
|  | AC196708SSR-4 | AAGCCTGAACTCAGGATCATCG | 300bp |
|  |  | TCACATTTGCACGTTCTTGAGC |  |
|  | AC233922SSR-1 | GAGATACTGAAACAGGCACCGT | 207bp |
|  |  | CTGTTGTGTTCTCGATGCCCTA |  |
|  | AC204715SSR-3 | GGTTAGGCAAGACTTCAGTGGA | 198bp |
|  |  | GAGGTTGTACACGGTGCACTT |  |
|  | AC191360SSR-3 | CGCGCGCTGATGCTAGATTG | 179bp |
|  |  | CTCCTGCCGACCCACTACAAAT |  |

**4.4 定位区间内基因预测分析**

从网站<www.maizesequence.org>上下载精细定位区段0.35Mb序列的fasta文件。利用softberry上的基因分析与预测软件FGENESH对候选区段进行基因预测。利用blastP工具比对蛋白质数据库，结果发现除去转座子和反转座子外，共有15个基因，其中8个是未知蛋白基因，剩余7个功能基因见表4.2。

**表4.2 目标区域候选基因预测**

**Table 4.2 Gene prediction of candidate region**

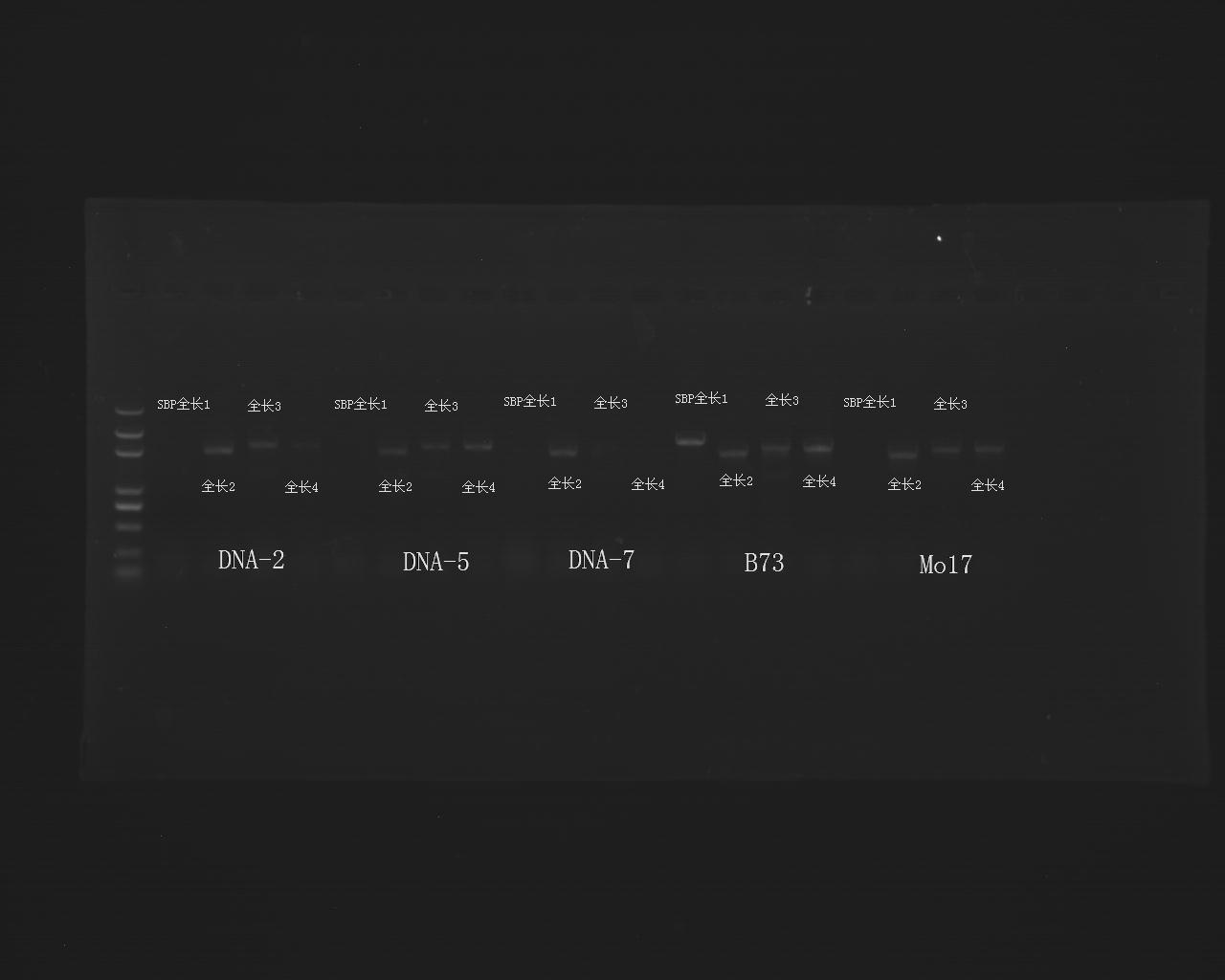
|  |  |
| --- | --- |
| **Gene ID** | **Annotation** |
| GRMZM2G165966 | molybdopterin biosynthesis MoaE family protein |
| GRMZM2G065451 | **SBP transcription factor** |
| GRMZM2G139372 | Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein |
| GRMZM2G123511 | trehalose-6-phosphate synthase |
| AC233922.1\_FG008 | ubiquitin-conjugating enzyme 29 |
| GRMZM5G846811 | Putative ROP family GTPase ROP2 |
| GRMZM2G090156 | methyltransferases |

查找相关文献，发现SBP基因在拟南芥中与花粉囊的发育有关[45]，花粉囊的不正常发育，导致孢子母细胞在减数分裂前流产，从而使育性降低。因此，SBP很有可能是我们的候选基因。为了进一步确定候选基因，我们在SBP的5’和3’端设计引物（表4.3），扩增雄性不育突变体和B73、Mo17的基因组DNA（图4.7），PCR产物做连接转化进行测序分析。测序结果表明突变体SBP基因在第三个外显子的102bp处发生碱基替换，由碱基G变为碱基A，使编码的氨基酸由原来的甘氨酸变为丝氨酸（图4.8）。这一突变符合EMS突变的规则。为了进一步确定突变位点，我们在发生碱基突变的上下游设计一对引物（表3.3），再次扩增不育株和B73的基因组DNA及cDNA（图4.9），PCR产物进行测序分析，测序结果与之前结果相同。由此说明*Nms1*突变体中SBP基因第三个外显子上碱基G突变成A是EMS突变位点。SBP是我们的候选基因。

**表4.3 候选基因SBP-box的验证引物**

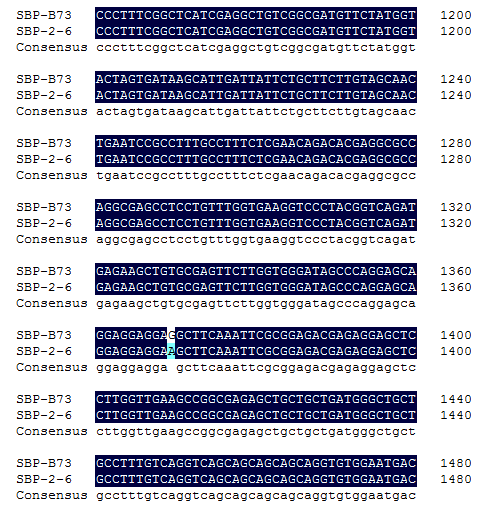
**Table 4.3 Validation primers of candidate gene SBP-box**

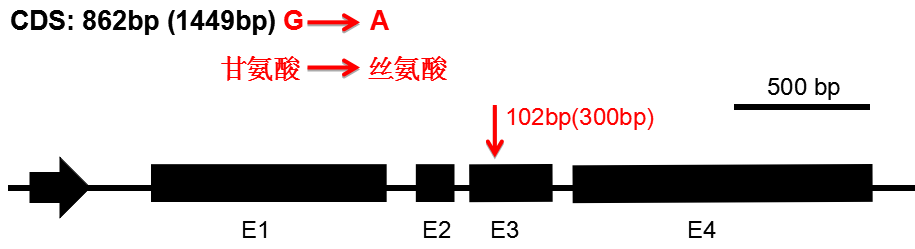
|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 引物作用 | 引物名称 | 引物序列（5’to 3’） | 扩增长度 |
| 扩增基因全长 | SBP全长-1 | AGAGAGGAACAGGGTACACAGA | 2575bp |
|  |  | AGAACTTCAACTGCTAGCGTCA |  |
|  | SBP全长-2 | CTCTCTCTCTTGGTGCTGCTAC | 2058bp |
|  |  | CATCTCCAGTTCTCCACCACAA |  |
|  | SBP全长-3 | GGTTATGTTCCCTTGCCTCTCT | 2301bp |
|  |  | GAACTTCAACTGCTAGCGTCAC |  |
|  | SBP全长-4 | CCCGAACCCTTTCTGCTCTTTA | 2258bp |
|  |  | GGGTTGCGCTCCTAGTTCTAAT |  |
| 验证突变位点 | SBP下-1 | GTCGGCGATGTTCTATGGTACT | 893bp |
|  |  | CATCTCCAGTTCTCCACCACAA |  |
| 验证突变位点 | SBPcDNA-1 | CAGATTTCGGATCCTGGCACT |  |
|  |  | CATCTCCAGTTCTCCACCACAA |  |
|  | SBPcDNA-2 | AGGAGCAGCAGCTCAGATTTC |  |
|  |  | GCGTCACAAAACCGTGGATTAT |  |

****

**图4.7 SBP全长引物扩增基因组DNA**

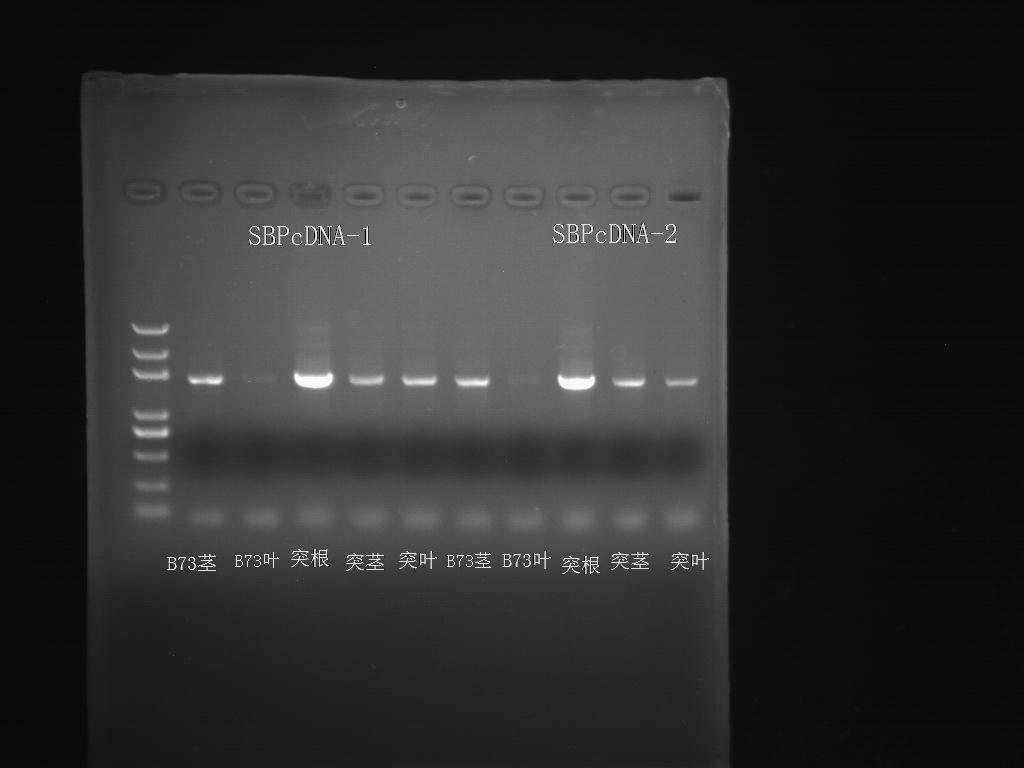
**Fig.4.7 Amplification of genomic DNA with primers of full-length SBP**





**图4.8 *N******ms1*突变体中SBP-box基因突变位点的确定**

**Fig.4.8 Determination of gene mutation site of SBP-box in *Nms1* mutant**



**图4.9（1）SBP下-1引物扩增基因组DNA（2）SBPcDNA引物扩增cDNA**

**Fig.4.9 Amplifications of (1) genomic DNA with primers of SBPxia-1 and**

**(2) cDNA with primers of SBPcDNA**

**5 讨论**

目前，从表型得到的未知的雄性不育突变体有数百个之多，尽管资源丰富，但仅有一小部分的雄性不育突变体在细胞学水平上得到研究，而已被克隆的基因就更少了，且全是核质互作型基因，尚未发现有对玉米雄性核不育基因成功克隆的先例。

本研究以Mo17为轮回亲本构建了BC1分离群体，利用集团分离分析法和SSR标记，不断缩小定位区间，通过基因预测、功能注释，最终确定了候选基因SBP-box。这对研究花药发育及雄性不育机理等方面具有重要的价值与意义。

从前人的报道来看，SBP-box基因在拟南芥中与花粉囊的发育相关，使得孢子母细胞在减数分裂前就已流产，从而导致育性降低[45]。但与本实验不同的是，该突变体表现为隐性性状。之后，我们比对了玉米与拟南芥中SBP-box基因的cDNA序列，发现两者的一致性很差。由此，我们猜测SBP-box基因在物种进化的过程中可能发生了功能变异。

本实验虽已初步确定了玉米核雄性不育突变体*Nms1*的候选基因为SBP-box，但尚未对其功能进行进一步的验证。因此，构建超表达载体，对拟南芥进行遗传转化，将是未来实验的研究重点。如果拟南芥表现为不育突变表型，则将SBP-box超表达载体转入玉米进行进一步功能验证。与此同时，还要比较观察突变体和野生型之间花药不同发育阶段的表型变化，为下一步深入研究花药发育及雄性不育机理做准备。

**参考文献：**

1. kaul MLH.*Male sterility in higher plants*[M].Belin,New York:Spinger-Verlag,1988.
2. Sears ER.*Geneties and farming*.Yearbook,1947,245-255.
3. Edwardson JR.Cytoplasmic male-sterility.*The Bot*.Rev.1956,22:296~732.
4. 余永亮.两份太空诱变玉米不育突变体的遗传研究及SSR分子标记定位[D].河南农业大学，2007.
5. 汤继华，赫忠友，谭树义，等.玉米温敏性核雄性不育系育性机制转换研究[J].河南农业大学报，2000，34（1）：4-6.
6. 李小琴，刘纪麟，王相琴.玉米细胞质雄性不育材料研究的进展[J].作物杂志，1999，（4）： 10-12.
7. 孙庆泉，荣廷昭.玉米胞质雄性不育材料的研究和利用[J].四川农业大学学报，2003，21 （1）： 49-52.
8. 刘纪麟.玉米育种学[M].北京：农业出版社，1991：383.
9. 李婉莎，杨红玉.花药绒毡层发育相关基因的研究进展[J].安徽农业大学，2007，（14）：4120-4123.
10. 康俊根.四种类型甘蓝雄性不育系花药败育特征及基因表达谱分析[D].中国农业科院，2006.
11. 赵前程，耿宵，陈雪平.等.花椰菜雄性不育系小孢子发育过程及其POD活性[J].分子植物育种.华北农学报，2002，（2）：108-111.
12. 陈睿，李清贤，于法科等.一个水稻雄配子不育基因MGA1(t)的遗传及表达特征分析[J].分子植物育种，2011，（6）：656-664.
13. Hong L,Tang D ,Shen Y,et al.New Phytol.*2012 Oct;196(2):*402-13.
14. 刘尚杰，郑洲，田志宏. 水稻显性核不育的研究和利用进展[J]. 湖北植保，2013，（1）：56-59.
15. 周巍，许明. 不结球白菜细胞核雄性败育过程的细胞学研究[J]. 湖北植保，2013，（1）：56-59.
16. 张虹，梁婉琦，张大兵. 花药绒毡层细胞程序性死亡研究进展[J].上海交通大学学报： 农业科学版，2008，26（1）：86-90.
17. 戴文懿，孙亚梅，高贝，等.拟南芥温敏雄性不育突变体atms1的获得及表型分析[J].上海大学学报：自然科学版，2011，17（5）：681-686.
18. 许忠民，张思慧，程永安，等.甘蓝胞质雄性不育系CMS258小孢子发生的细胞学研究[J].西北农业学报，2012，21（3）：118-121.
19. 施展，万正杰，徐跃进，等.大白菜新型细胞质雄性不育株6w-9605A的育性鉴定和花药败育的细胞学观察[J].植物细胞学报，2012，30（1）：49-54.
20. 杨绍华，陈睿，李华清，等.水稻雄配子不育突变体mga36的鉴定与初步分析[J].福建农业学报，2012，（10）：1039-1043.
21. Armstrong SJ, CaryI AP, Jones GH,et al.Asy1,a protein required for meiotic chromosome synapsis,localized to axis-associated chromatin in Arabidopsis and Brassica.J Cell Sci.2002 Sep 15;115(Pt 18):3645-55.
22. Nonomura KI, Nakano M, Murata K, et al. An insertionalb mutation in the rice PAIR2 gene,the Ortholog of Arabidopsis ASY1, results in a defect in homologous chromosome pairing during meiosis. Mol Gene Genomics. 2004 Mar; 271(2):121-9.
23. Yang X, Makaroff CA ,MaH. The Arabidopsis MALE MEIOCYTE DEATH1 gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis, Plant Cell. 2003 Jun ;15(6): 1281-95.
24. Ito T ,Wellmer F, Yu H, et al .The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of SPOROCYTELESS [J].Nature. 2004 Jul 15; 430(6997) :356-360 .
25. Sorensen AM, Krober S ,Unte US, et al .The Arabidopsis ABORTED MICROSPORES (AMS)gene encodes a MYC class transcription factor [J]. Plant J .2003 Jan;33(2): 413-423.
26. 陈伟伟.拟南芥Male sterile 2控制花药外壁形成的生化机理研究 [D].上海交通大学，2012.
27. Ma,H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis inflowering Plants. Annu. Rev. Plant Biol. 2005,56:393-434.
28. Paxson-Sowders DM, Dodrill CH, Owen HA, et al. DFX1, a novel plant protein, is requried for exine pattern formation during pollen development in Arabidopsis. Plant physiol. 2001 Dec; 127(4):1739-49.
29. DongX, Hong Z, Sivaramakrishnan M, et al. Callose synthase(CalS5) is requried for exine formation during microgometogenesis and for pollen viability in Arabidopsis. Plant J. 2005 May; 42(3):315-28.
30. Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K ,et al. Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting on male sterility in Arabidopsis thaliana. Plant J. 2004 Jul; 39(2):170-81.
31. Fei H, Zhang R ,Pharis RP, et al. Pleiotropic effects of the male sterile 33(ms33) mutation in Arabidopsis are associated with modifications in endogenous yibberellins, indole-3-acetic acid and abscisic acid. Planta. 2004 Aug; 219(4): 649-60.
32. Hsu, S. Y., and P. A. Peterson, 1981 Relative stage duration of microsporogenesis in maize. Iowa State J. Res. 55: 351–373.
33. Chang, M. T., and M. G. Neuffer, 1994 Chromosomal behavior during microsoporogenesis,pp. 460–475 in The Maize Handbook, edited by M.Freeling, and V. Walbot. Springer-Verlag, New York.
34. P. C. Cheng, Study of tapetum in genic male-sterile (ms10) maize (Zea mays L.), 1997 Jun, 42(2): 185-188.
35. 李竞雄，周洪生，孙荣锦，1998. 玉米雄性不育生物学. 北京：中国农业出版社，67-154.
36. 邓迎海，周洪生.玉米雄性不育基因的利用[J].玉米科学，1998，6（2）：1-5.
37. 梁业红，周洪生，蒋琬茹. 玉米雄性不育基因（ms30）的RFLP作图[J]. 作物学报，2000，（3）：266-270.
38. Cigan, A. M., E. Unger, R.-J. Xu, T. Kendall, and T. W. Fox,2001 Phenotypic complementation of ms45 maize requires tapetal expression of MS45. Sex. Plant Reprod. 14: 135–142.
39. Coulson A, Sulston J, Brenner S, Karn J (1986) Toward a physical map of the genome of the nematode Caenorhabditis elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences 83*:7821
40. Peters JL, Cnudde F, Gerats T (2003) Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends in plant science 8*:484-491.
41. 白凤虎，李德芳，陈安国，唐慧娟.基于BSA分析法的分子标记基因定位技术在农作物中的应用[J].中国麻林科学，2006，28（6）：282-288.
42. Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The plant journal 4*:403-410.
43. 张玉山，邢永忠.小麦数量性状和其位点的基因图位克隆研究进展[J].分子植物育种.，2006，4：1-7.
44. 景润春，黄青阳，朱英国.图位克隆技术在分离植物基因中的应用[J].遗传，2000，22：180-185.
45. Unte,U.S.,Sorensen,A.M., et al.(2003,April).SPL8, an SBP-Box gene that affects pollen sac development in arabidopsis.*The Plant Cell, Vol. 15*, 1009–1019.

**致谢：**

本论文是在指导老师刘朝显的悉心指导下完成的，从论文的选题、实验，直至最终的论文构思与撰写，无不倾注着老师的心血。刘朝显老师不仅要求严格，且拥有严谨的科学精神、科学的治学方法、精益求精的工作作风以及对待学生亲和的态度，这些都深深的感染和激励着我，并将使我受益终生。希望借此机会向刘朝显老师表示我最衷心的感谢，感谢刘老师对我的耐心教导与关怀，感谢给予我的建议与督促，同时感谢他的谅解与包容！

我非常荣幸能够在玉米研究所这个团结有爱、充满活力又不失学术氛围的团体中完成我的毕业实习和论文。在实验室实习的过程中，我曾向玉米组的各位老师以及师兄、师姐和同学们请教过不少问题，正是有了你们的热心帮助与支持才使我的毕业实验能够较为顺利地完成，在此我要向你们表示深深的感谢！

我还要感谢所有教导、关心过我的老师，特别是我的班主任刘志斋老师，感谢刘老师最初带我进入实验室学习。他为我们的班级、我们的学业倾注了大量的心血，是一位尽职尽责的好老师，为人师表的风范令我敬仰，谨向刘志斋老师致以我最崇高的谢意！

感谢这篇论文所涉及到的各位学者，如果没有你们的研究成果的启发与帮助，我将难以完成本论文的撰写，在此，向学术界的各位前辈致敬！

最后，衷心的感谢在百忙之中评阅论文的各位老师、专家、教授，谢谢你们！

高捷

2016年5 月1 日