DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.202423.0665

辣椒雄性不育的分子研究进展

张怡文^{1,2},徐兰婷^{1,2},王 飞^{2,3},刘奕清^{1,2},姚明华^{1,2,3},徐 凯²

(1.长江大学香辛作物研究院•长江大学园艺林学学院 湖北荆州 434025; 2.蔬菜种质创新与遗传改良湖北省重点实验室• 湖北省农业科学院经济作物研究所 武汉 430064; 3.湖北洪山实验室 武汉 430070)

摘 要:辣椒(Capsicum annuum L.)是世界上重要的蔬菜作物之一,杂种优势明显。利用雄性不育系制种可有效解决人工去雄的难题,简化制种工序,降低生产成本。而辣椒雄性不育是一个快速发展的研究领域。综述了近几年在辣椒雄性不育的类型与特点、细胞学特征、细胞核雄性不育的分子机制,以及细胞质雄性不育的机制解析等方面所取得的重要进展,并对辣椒雄性不育中存在的问题以及未来发展方向进行了讨论和展望,旨在为辣椒三系配套制种提供理论参考。

关键词:辣椒;细胞核雄性不育;细胞质雄性不育;细胞学特征

中图分类号:S641.3

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2024)02-001-07

Molecular research progress of male infertility in Capsicum annuum L.

ZHANG Yiwen^{1,2}, XU Lanting^{1,2}, WANG Fei^{2,3}, LIU Yiqing^{1,2}, YAO Minghua^{1,2,3}, XU Kai²

(1. Spice Crops Research Institute, Yangtze University/College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China; 2. Hubei Province Key Laboratory of Vegetable Germplasm Innovation and Genetic Improvement/Institute of Economic Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, Hubei, China; 3. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, Hubei, China)

Abstract: Pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the important vegetable crops in the world, with obvious heterosis. Using the male sterile line to produce hybrids can effectively replace manual emasculation, thereby simplifying the seed production process and reducing production costs. The research on male infertility in pepper is a rapidly developing field. We reviewed the important progress in the types, characteristics and cytological features of male infertility, the molecular mechanism of genic male sterile and cytoplasm male sterility in pepper. Further, the problems and development directions of male infertility in pepper were discussed and prospected, aiming to provide a theoretical reference for the three-line system of hybrid seed production for pepper.

Key words: Capsicum annuum L.; Genic male sterile; Cytoplasm male sterility; Cytological features

辣椒为茄科辣椒属园艺植物,是全球规模最大的香料作物和调味品,也是我国栽培面积最大的蔬菜之一,常年栽培面积达3200万hm²,年产值逾2500亿元,栽培面积和总产量居世界首位,且有继续增加的趋势^山。杂交品种被广泛应用于辣椒生产,可显著提高辣椒的产量、抗性和品质。然而,目前辣椒杂交种的生产仍以人工去雄为主,授粉过程技术性强且劳动密集,成本巨大,种子纯度难以保证。因此,利用雄性不育系可有效解决人工去雄的

难题,简化制种工序,降低生产成本,进而应用于辣椒杂交种的商业化高效生产[2]。

1 辣椒雄性不育的类型与特点

辣椒雄性不育主要包括两种类型,细胞质雄性不育(cytoplasm male sterility, CMS)和细胞核雄性不育(genic male sterile, GMS)[3-4]。GMS 只由细胞核基因控制,不受细胞质影响,且育性遗传符合孟德尔遗传定律;而CMS 是一种母系遗传性状,雄性

收稿日期: 2023-10-16; 修回日期: 2023-11-22

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2022BBA0061,2023BBB013,2023BBB044); 湖北省援疆援藏项目(2022BGD008); 湖北省农业科技创新中心项目(2021-620-000-001-007); 湖北省自然科学基金青年项目(2022CFC055); 湖北省支持种业高质量发展资金项目(HBZY2023B004-4)

作者简介: 张怡文, 女, 硕士, 主要从事辣椒生物技术研究。E-mail: z13554594558@163.com

通信作者:姚明华,男,研究员,主要从事辣椒遗传育种方面的研究工作。E-mail:yaomh 2008@126.com

徐 凯,男,助理研究员,主要从事辣椒分子育种与生物技术研究工作。E-mail:kaixu@hbaas.com

不育由细胞核和线粒体基因共同决定^[5]。 CMS 通常是由线粒体基因组开放阅读框的重排引起的,来自核基因组的育性恢复基因 Rf 可抑制不育表型,促使育性恢复^[6]。

CMS 和 GMS 均已应用于辣椒的杂交种生产,带来了巨大的经济和社会效益[7]。其中,GMS 的选育和转育较为简单,育性稳定、恢复源广,制种过程中母本通常需要拔除 50%的可育株,但第三代杂交水稻育种技术^[8]的推出为 GMS 的应用提供了新的思路。 CMS/Rf 系统可提供 100%的雄性不育株用于杂交制种,在生产上具备独特优势,是植物杂种优势利用的重要途径之一^[9]。但 CMS/Rf 系统的恢复源较少,在大多数大果型甜椒和少量微辣甜椒中较难选配到合适的恢复系,需通过转育恢复基因的方式来人工创制恢复系^[10]。

2 辣椒雄性不育的细胞学特征

育性与植物复杂的花药和花粉发育过程紧密 相关,该过程的终止或异常都可能引起雄蕊发育不 良,最终导致雄性不育。一般而言,不育系、恢复系 和保持系三者花药的形态存在明显差异。辣椒不 育系的花药瘦小、干瘪、无花粉或花粉粒极少,花粉 粒碘化反应不着色或着色极淡,恢复系和保持系的 花药大而饱满,成熟花粉中充满淀粉粒。不同作物 发生败育的时期和形态学变化都有较大的差异,但 雄性不育通常是由花药组织特别是绒毡层细胞的 提前降解或过早细胞程序性死亡所导致的凹。花粉 在发育过程中从小孢子母细胞到四分体,经历单核 期、双核期和三核期的整个过程都可能导致花粉发 育异常[6]。其中,辣椒 CMS 不育系 HZ1A 的雄性不 育开始于小孢子发育的四分体阶段,不育系中仅能 观察到极少数异常和不规则的小孢子[12]。CMS 不 育系 A-line 的绒毡层细胞表现出空泡化和过早死 亡,紧紧包围并挤压小孢子,从而抑制胼胝体降解 和小孢子释放,最终导致小孢子在单核晚期破裂和 死亡[13]。辣椒 GMS 不育系 16C1369A 花粉败育的 关键阶段发生在四分体时期,也是由于绒毡层过度 空泡化并发生过早死亡,抑制胼胝体降解和小孢子 在四分体时期的正常释放[14]。通过石蜡切片观察 GMS 不育系 18Q5431A,发现绒毡层细胞过度空泡 化并挤压小孢子,抑制胼胝体降解和小孢子释放, 最终导致绒毡层细胞塌陷[15]。核不育突变体 msc-3 的花粉败育发生在小孢子发育的早期阶段,主要发 生在第3~6期,由于绒毡层的发育异常,致使四分 体的形成延迟和胼胝质壁残留,最终导致小孢子败育^国。由此可见,辣椒雄性不育的发生通常与绒毡层和胼胝体的异常发育紧密相关,但小孢子败育的时期不尽相同。

3 辣椒细胞核雄性不育的分子机制

辣椒细胞核雄性不育的研究相对深入,大多数辣椒 GMS 突变体的不育表型由单隐性基因控制,目前已对多个候选基因进行精细定位和功能验证。等位关系测验表明,ms1 到 ms4、ms6 到 ms8 均为非等位基因,ms1、ms3 和 ms10 彼此之间为非等位基因,ms12 与 ms1 和 ms2 为非等位基因,ms3 与 msw 为非等位基因,msc-2 与 msc-1 为非等位基因,但很可能与 ms1 为等位基因[4.15-17]。对核不育基因进行精细定位与克隆,筛选与 GMS 表型共分离或基于不育基因序列差异的分子标记,可以在苗期对不育株进行鉴别以减少定植株数,降低生产成本和缩短育种年限[18]。

Jeong 等[16]利用 1118 个单株的 F₂ 群体结合 HRM 标记,将 msl 基因缩小至 CM334 基因组 869.9 kb 的物理区间内,包含 11 个开放阅读框,其 中编码 PHD 型转录因子、可能参与花粉和绒毡层 发育调节的 CA05g06780 基因被确定为 ms1 候选基 因,并开发了1个共分离标记32187928-HRM。 Cheng 等[19]利用 BSA 测序结合 1110 个单株群体的 标记进行共分离检测后, Capana02g002096 (CaDYTI)被确定为 msc-1 基因的候选基因,且通 过 VIGS(virus induced gene silencing)技术降低该 基因的表达量后出现了雄性不育的表型,该基因编 码 bHLH 转录因子,可能参与了辣椒绒毡层的早期 发育,外显子7bp的缺失导致该转录过程提前终止 和功能丧失。Guo 等[20]通过 RNA 原位杂交试验,发 现 CaAMS(CaAMS1 和 CaAMS2-2)在四分体时期和 单核期在绒毡层中高表达, CaAMS 的下调会导致辣 椒花丝缩短、雄蕊萎缩和花粉败育。因此推测 CaAMS可能通过调节复杂的遗传网络在辣椒绒毡 层和花粉发育中发挥着重要作用。

Cheng 等¹¹⁵利用 BSA 结合图位克隆,将 *msc-2* 基因精细定位至 Zunla-1 基因组 336 kb 的候选区间内,其中 *Capana05g000766(CaMS1)*基因在辣椒花药中特异表达,推测该基因 T 碱基的缺失导致转录提前终止,致使不育系 18Q5431A 出现不育表型,并通过 VIGS 验证了 *msc-2* 候选基因的功能。对等位基因检测的结果表明 *msc-1* 和 *msc-2* 为非等位基

因,且通过双分子荧光互补证实了这2个基因在蛋 白质水平上没有发生直接互作。Dong 等[4]发现了1 个新的隐性核不育突变体 msc-3,并利用改进的 MutMap 方法和分子标记连锁分析对 msc-3 位点进 行精细定位,将其锁定在 Zunla-1 基因组 10 号染色体 139.91 kb 的区间内,共包含 10 个注释基因。比较 测序结果,发现不育系 Capana10g000198 基因的第 三外显子存在 163 bp 的 LTR 转座子插入,并据此 开发了 Ind198 功能标记,且该基因在保持系和不育 系花蕾的第 3~7 阶段差异表达,因此 Capana10g000198(CaMYB80)被确定为 msc-3 位点的候 选基因。笔者通过10个组织的qRT-PCR分析,发 现该基因只在花药中特异性表达。通过 VIGS 技术 使 Capana 10g000198 表达量下调后,出现明显的雄 性不育表型,且沉默单株中无法观察到花粉粒。综 上所述,目前已在辣椒中图位克隆和功能验证了3 个细胞核雄性不育基因(msc-1、msc-2 和 msc-3)。3 个基因均在辣椒花药中特异表达,通过编码转录因 子(bHLH、MYB)或 PHD-finger 蛋白,参与了辣椒 绒毡层发育和育性调控的整个过程,因外显子区的 序列缺失或转座子插入,最终导致了突变体的雄性 不育表型。

4 辣椒细胞质雄性不育的分子机制

4.1 辣椒细胞质雄性不育基因

细胞质雄性不育是高等植物杂种优势利用的 主要途径之一,因其母系遗传的特点在杂交制种上 具备独特优势。CMS 不育基因通常编码具有细胞 毒性的跨膜蛋白,导致线粒体功能改变从而出现雄 性不育^[21]。例如,WA352 与 COX11 互作影响过氧化物代谢,引发水稻绒毡层细胞程序性死亡和花粉败育,从而使水稻呈现野败型 CMS 表型^[11](图 1)。ORFH79 可与复合物 III 结合,并通过与 P61 亚基的相互作用降低其活性,引起线粒体能量代谢障碍和氧化应激,导致水稻红莲型 CMS 的花粉败育^[22]。辣椒不育表型的产生主要来源于自然突变。迄今为止,国内外研究人员围绕辣椒 CMS 突变体开展了大量研究^[23]。1958 年,Peterson^[24]首次在引进材料PI 164835 中发现了辣椒的 CMS 现象。在国内,杨世周等^[25]率先从品种向阳椒中分离到雄性不育株,并选育出不育系 8021A 及保持系 8021B,成功实现辣椒的三系配套制种。

辣椒 CMS 不育基因的研究相对滞后,前期通 过线粒体测序、拟南芥遗传转化等技术手段,鉴定 到 2 个不育基因 atp6-2 和 orf456,并据此开发出了 4 个特异性 SCAR 标记 CoxII、atp6、orf456-SCAR 和 SCAR130[26-27]。 Kim 等[27] 通过 Southern Blot 和 Northern Blot 技术,在线粒体基因组 coxII 基因的 3'末端鉴定到1个新的ORF,命名为orf456。该基 因编码产生 1 个约 17 kDa 的蛋白质产物,且不育系 的蛋白表达量明显高于恢复系。为了研究 orf456 蛋白在辣椒线粒体中的功能,Kim 等[27]利用线粒体 靶向的 orf456 基因载体转化拟南芥后,出现了雄性 不育表型且无法正常结实。orf507 是 orf456 基因 的变异转录本,在保持系中转入 orf507 会导致辣椒 出现雄性不育的表型[28]。进一步研究表明,含有线 粒体信号肽(MtATP6)的 ATP 合酶 6 kDa 亚基与 orf507 存在特异性的相互作用,ATP 合成酶的活性

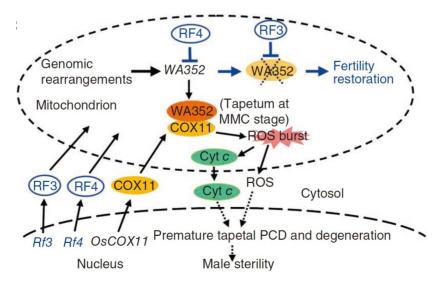


图 1 WA352 控制的细胞质雄性不育分子机制^[11]

Fig. 1 Molecular mechanism of cytoplasmic male sterility controlled by WA352[11]

和含量可能会影响辣椒 CMS 植株的花粉发育[29]。

Ji 等[26]研究发现不育系 HW203A 中 atp6-2 基 因的表达下调降低了 F1F0-ATP 酶的活性。线粒体 中的 orf507 和 atp6-2 基因可能分别参与细胞色素 C氧化酶和 F1Fo-ATP 酶的合成调控,从而影响 CMS 不育系的花药败育过程。orf165 基因可能也 参与了辣椒 CMS 表型的产生,在保持系 ML-14B 中过表达 orf165 会出现雄性不育的表型,而不育系 CMS-14A 中该基因的沉默则会导致育性恢复[30]。 Wang 等[31]通过对不育系 138A 及其保持系 138B 的 线粒体基因组测序组装,在138A和138B中分别鉴 定出超过 214 个和 215 个长度超过 100 个氨基酸 的开放阅读框。其中 orf300a 和 orf314a 被预测为 不育系 138A 不育表型的候选基因,并开发了1个 新的共分离标记 orf300a,已成功应用于 CMS 材料 的筛选。开发不育基因相关的分子标记为快速筛 选不育株、保持株及转育新的不育系创造了条件, 提高了育种的准确性和选择效率,为进一步探索细 胞质雄性不育的败育机制及不育基因的克隆提供 帮助。

4.2 辣椒细胞质雄性不育恢复基因

恢复 CMS 育性在杂交生产中至关重要, Rf 基 因通常会影响 CMS 相关基因的蛋白质表达,促使 育性恢复,因此被认为可减少或消除 CMS 相关基 因所造成的不利影响[32]。CMS/Rf系统为研究核质 互作信号交流提供了理想材料,同时也广泛应用于 水稻、油菜、玉米等作物的商业杂交种生产。近10 年来,随着植物参考基因组的陆续公布,CMS恢复 基因的研究成为热点之一。目前已从水稻、玉米、 油菜、小麦和大豆等作物中鉴定报道了 10 多个 Rf 基因。Rf基因通常影响线粒体中不育基因的转录, 从而恢复不育系的育性。例如,Rf4 基因通过降低 WA352 的转录本水平,促使水稻野败型 CMS 花粉 育性恢复[33]; Rf6 蛋白与 HXK6 互作, 降低了红莲型 CMS 中 atp6-orfH79 转录本的积累,从而保证水稻 花粉的正常发育[34];玉米 Rf3(PPRK2)基因通过抑 制线粒体 orf77 基因的编辑和降解,加速不育基因 orf355 的降解,从而恢复 CMS-S 的育性[35]。

目前克隆的大多数 Rf 基因编码包含多个五肽重复序列结构域的 PPR 蛋白,包括水稻中的 Rf4、Rf1a、Rf1b(Rf5)与 Rf6,油菜中的 Rfn、Rfp与 Rfh,玉米中的 Rf1 和 Rf3,萝卜中的 Rfo,小麦中的 RFL79与 RFL29a,以及大豆中的 GmPPR576等[36]。 PPR 蛋白是陆生植物最大的蛋白家族之一,在大多数物

种中拥有 400 多个成员。PPR 蛋白在植物转录后 mRNA 加工中发挥重要作用,包括 RNA 编辑、剪接、切割和降解。PPR 蛋白通常由多个 PPR 基序串联组成,根据所含重复基序的不同可将 PPR 蛋白划分为 P 亚家族和 PLS 亚家族[37]。大多数恢复基因属于 P 亚家族的 RFL (restorer-of-fertility-like)家族分支,具有 P 亚家族的典型结构特征。RFL 家族基因常以基因簇的形式存在,例如,水稻恢复基因Rf4、Rf1a与 Rf1b 位于同一基因簇内[131]。

在辣椒 CMS 的相关研究中,大多报道认为育性恢复是 1 个基因控制的显性性状[38],也有研究者发现,育性恢复是 1 个主效 QTL 和 4 个微效 QTL 控制的数量性状[39],不育表型也可能受到温度的影响[40]。在 CM334 和 Zunla-1 参考基因组发布前,CMS 恢复基因的研究以 QTL 定位和标记开发为主。Zhang 等[41]、Min 等[42]利用 F₂群体结合 BSA 开发出 2 个与 Rf 基因连锁的 RAPD 标记 OP131400和 OW19800,遗传距离分别为 0.37和 8.12 cM,其中 OP131400被广泛应用于后续研究。Lin 等[9]、Gulyas 等[38]报道了 1 个高精度的 SCAR 标记 CRF-SCAR,并成功应用于甜椒恢复系的 MAS 转育。Jo 等[43]在恢复基因 CaPPR6 附近开发标记 ColMod1- CAPS,与 Ortega 等[44] 开发的标记 CaRf648均显示出 90%以上的鉴定准确度。

随着生物信息学的发展和辣椒全基因组测 序的完成,多个辣椒恢复基因被相继克隆和报道 (表 1),包括 CaPPR6、Capana06g003028、CaRf032 (CA00g82510) 、CA00g30080、Capana06g002968、 Capana06g002967和 Capana06g2002969[3,36,45-47]。 其 中,Jo等[43]利用BAC文库筛选结合BSA-AFLP技 术,将恢复基因定位在821kb区间,根据转录本表 达分析和序列特征,最终确定 CaPPR6 为 Rf 候选基 因。Wu 等[47]基于 SLAF-seq 测序技术结合 GWAS 分析,鉴定到 2 个 Rf 候选基因 Capana 06g002967 和 Capana06g002969。Cheng 等[46]通过构建辣椒高 密度 SNP 遗传图谱,成功将恢复基因精细定位至 Zunla-1 基因组 270.10 kb 的物理区间内,并将 Capana06g003028 确定为候选基因。Zhang 等^[3]利用 KASP 标记将恢复基因定位到 Zunla-1 基因组 6 号 染色体 148.05 kb 的区间内,并推测是候选基因 CaRf032(CA00g82510)的变异导致了转录提前终 止。 Kang 等[45] 将恢复基因 Rfu 精细定位至 UCD10X 基因组 6 号染色体 398 kb 的区间内,编码 PPR 蛋白的 CA00g30080 基因被确定为 Rfu 候选基

Table 1 Summary of Ki candidate genes that have been reported in pepper				
位点名称	区间大小	物理区间	候选基因	参考文献
Locus name	Interval size/kb	Physical interval(Zunla-1 V2.0)	Candidate gene	References
CaPPR6	821.00	Nearby Chr06: 216,988,988	BAC-Contig 85	JO YD, et al ^[43]
CaRf	270.10	Nearby Chr06:217,065,420	Capana06g003028	CHENG J W, et al[46]
CaRf032	148.05	Chr06: 213,923,525 214,071,576	CA00g82510	ZHANG Z H, et al ^[3]
Rfu	398.00	Nearby Chr06: 214,076,189	CA00g30080	KANG M C, et al ^[45]
$CaRf_{HZ}$	533.81	Chr06:215,097,259 215,631,069	Capana06g002968	NIE Z X, et al ^[36]
Rf	858.26	Chr06: 214,868,888 215,727,145	Capana06g002967 Capana06g2002969	WU L, et al ^[47]

表 1 辣椒中已报道的 Rf 候选基因汇总

Fable 1 Summary of Rf candidate genes that have been reported in pepper

因。Nie 等^[36]基于 BSA 结合图位克隆的手段,将恢复基因 CaRf_{HZ}精细定位至 Zunla-1 基因组 533.81 kb 的区间内,并将 Capana06g002968 确定为候选基因。然而,因二代参考基因组的局限性,CaPPR6、CaRf032、Rfu 的候选基因均不能比对到参考基因组6 号染色体。辣椒 CMS 恢复基因的研究仍停留在精细定位阶段,国内外尚未见 CMS 恢复基因功能验证的研究报道,且育性调控机制有待进一步研究。

5 展 望

随着现代分子生物学的快速发展,分子标记辅助选择极大地缩短了育种时间并提高了转育效率,但是依旧需要 5~6 代的转育和自交纯化,导致辣椒分子育种发展缓慢。目前而言,辣椒雄性不育在生产实践和理论研究方面都取得了较大的进展,CMS和 GMS 均已应用于辣椒的杂交种生产,但仍然面临着许多挑战和未知领域。

5.1 应用生物工程创制辣椒雄性不育系

现有辣椒 CMS/Rf 系统具有技术复杂性高、所需条件苛刻的特点,不育表型易受到基因型和环境条件的干扰且恢复源少。部分辣椒尤其是甜椒 CMS 不育系很难找到恢复系,有些能找到恢复系但难以测出强优组合,不育和恢复基因的转育受限于轮回亲本的遗传背景[48]。同时,国内胞质不育材料的同质性较高,造成了基础研究的部分重复和资源浪费。而利用基因工程手段创制新的不育系,可有效避免自然突变和人工筛选费时费力的缺点。通过基因编辑、远缘杂交和原生质体融合等生物技术创制雄性不育系,挖掘新的不育基因和恢复基因,明确恢复基因在自然群体中的分布规律,可进一步拓展辣椒杂种优势利用的胞质类型,为三系配套制种奠定坚实的理论基础。

与此同时,辣椒 GMS 育性控制新基因的挖掘与功能研究,逐渐成为近几年雄性不育研究的热点之一[4]。第三代杂交水稻育种技术[8]和玉米 SPT (seed production technology)技术[49]的推出为辣椒隐性核不育系的生产应用提供了新的思路,可通过转基因等技术手段建立非转基因遗传背景的辣椒隐性核不育三系配套制种体系,有效解决拔除 50%可育株的技术难题。但前提是建立简单高效的辣椒遗传转化体系,同时遗传转化效率低也极大地限制了 CRISPR/Cas9 技术在辣椒中的应用。

5.2 结合新技术进一步加强雄性不育机制研究

近几年随着现代分子生物学技术的快速发展,多个作物中 Rf 基因的图位克隆和功能研究取得了较大进展,不育基因与 Rf 基因间的互作机制也逐渐明晰^[36]。辣椒 CMS/Rf 系统的育性是由线粒体基因所控制的,但控制这种性状的基因及其调控花器官发育的分子机制仍然不明确。不育性在不同环境中的不稳定也是限制辣椒 CMS/Rf 系统应用的一大障碍,需对辣椒 CMS 不育系的温敏特性进行系统研究,尤其是温度调节育性改变的分子机制^[50]。

育性恢复是由多因素在多个维度共同精细调控的复杂过程,需要从基因、mRNA、蛋白质、小分子代谢物和表观修饰等多个层面,深入解析辣椒细胞核 Rf 基因与线粒体不育基因间的相互作用关系,揭示育性恢复的调控机制。同时,因二代参考基因组的局限性,CMS 恢复基因位点 CaPPR6、CaRf032、Rfu 的候选基因均不能比对到辣椒 6 号染色体,而T2T 基因组测序为辣椒高质量基因组的组装提供了可能。未来可以通过辣椒线粒体和细胞核基因组的T2T 测序,结合泛基因组、转录组、代谢组、蛋白组和表观基因组等前沿技术共同探究 CMS 育性调控的分子机制[51-52]。

因此,在辣椒雄性不育工作中,CRISPR/Cas9、VIGS、T2T基因组测序和多组学联合分析等新技术新方法的广泛应用,势必会加快辣椒雄性不育的研究进程,使得辣椒雄性不育研究取得新的突破和进展,为三系配套制种提供遗传资源、奠定理论基础,进一步推动辣椒雄性不育商业杂交种的生产。

参考文献

- [1] 王立浩,张宝玺,张正海,等."十三五"我国辣椒育种研究进展、产业现状及展望[J].中国蔬菜,2021(2):21-29.
- [2] DANIELL H, CHASE C. Introduction to the molecular biology and biotechnology of plant organelles[M]//DANIELL H, CHASE C. Molecular biology and biotechnology of plant organelles: Chloroplasts and mitochondria. Dordrecht: Springer, 2004:1-12.
- [3] ZHANG Z H, ZHU Y S, CAO Y C, et al. Fine mapping of the male fertility restoration gene *CaRf032* in *Capsicum annuum* L.[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133(4):1177-1187.
- [4] DONG JC, HU F, GUAN W D, et al. A 163- bp insertion in the *Capana10g000198* encoding a MYB transcription factor causes male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. The Plant Journal, 2023, 113(3):521-535.
- [5] CHEN Z, ZHAO N, LI S, et al. Plant mitochondrial genome evolution and cytoplasmic male sterility[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2017, 36(1):55-69.
- [6] CHASE C D. Cytoplasmic male sterility: A window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions[J]. Trends in Genetics, 2007, 23(2):81-90.
- [7] 程翔,汤冰倩,刘峰,等.辣椒雄性不育分子标记研究进展[J]. 辣椒杂志,2020,18(4):40-45.
- [8] LIAO C C, YAN W, CHEN Z F, et al. Innovation and development of the third-generation hybrid rice technology[J]. Crop Journal, 2021, 9(3):693-701.
- [9] LIN S W, SHIEH H C, WANG Y W, et al. Restorer breeding in sweet pepper: Introgressing Rf allele from hot pepper through marker-assisted backcrossing[J]. Scientia Horticulturae, 2016, 197:170-175.
- [10] SWAMY B N, HEDAU N K, CHAUDHARI G V, et al. CMS system and its stimulation in hybrid seed production of *Capsicum annuum* L[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 222:175-179.
- [11] LUO D P, XU H, LIU Z L, et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. Nature Genetics, 2013, 45(5):573-577.
- [12] NIE Z X, CHEN J Y, SONG Y P, et al. Comparative transcriptome analysis of the anthers from the cytoplasmic male-sterile pepper line HZ1A and its maintainer line HZ1B[J]. Horticulturae, 2021, 7(12):580.
- [13] GUO J J, WANG P, CHENG Q, et al. Proteomic analysis reveals strong mitochondrial involvement in cytoplasmic male sterility of pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Journal of Proteomics, 2017, 168:15-27.

- [14] CHENG Q, LI T, AI Y X, et al. Complementary transcriptomic and proteomic analysis reveals a complex network regulating pollen abortion in GMS (*msc-1*) pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20 (7):1789.
- [15] CHENG Q, LI T, AI Y X, et al. Phenotypic, genetic, and molecular function of *msc-2*, a genic male sterile mutant in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133(3):843-855.
- [16] JEONG K, CHOI D, LEE J. Fine mapping of the genic male-sterile *ms1* gene in *Capsicum annuum* L[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131(1):183-191.
- [17] NARESH P, LIN S W, LIN C Y, et al. Molecular markers associated to two non-allelic genic male sterility genes in peppers (*Capsicum annuum* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1343.
- [18] 张锐,尚伟,许旭明.辣椒雄性不育的选育及利用研究进展[J]. 分子植物育种,2020,18(18):6143-6157.
- [19] CHENG Q, WANG P, LIU J Q, et al. Identification of candidate genes underlying genic male-sterile *msc-1* locus via genome resequencing in *Capsicum annuum* L[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131(9): 1861-1872.
- [20] GUO J J, LIU C, WANG P, et al. The *Aborted microspores* (*AMS*)-like gene is required for anther and microspore development in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(5):1341.
- [21] KIM Y J, ZHANG D B. Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(1): 53-65.
- [22] WANG K, GAO F, JI Y X, et al. ORFH79 impairs mitochondrial function via interaction with a subunit of electron transport chain complex III in Honglian cytoplasmic male sterile rice[J]. New Phytologist, 2013, 198(2):408-418.
- [23] COLOMBO N, GALMARINI C R. The use of genetic, manual and chemical methods to control pollination in vegetable hybrid seed production: A review[J]. Plant Breeding, 2017, 136 (3): 287-299.
- [24] PETERSON P A. Cytoplasmically inherited male sterility in *Capsicum*[J]. American Naturalist, 1958, 92(863):111-119.
- [25] 杨世周,赵雪云.辣椒 8021A 雄性不育系的选育及三系配套[J].中国蔬菜,1984(3):9-13.
- [26] JI J J, HUANG W, YIN C C, et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase and F₁F₀-ATPase dysfunction in peppers (*Capsicum an-nuum* L.) with cytoplasmic male sterility and its association with *orf* 507 and *atp6-2* genes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(1):1050-1068.
- [27] KIM D H, KANG J G, KIM B D. Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated *orf456* gene of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Molecular Biology, 2007,63(4):519-532.
- [28] JI J J, HUANG W, LI Z, et al. Tapetum-specific expression of a cytoplasmic *orf* 507 gene causes semi-male sterility in transgenic

- peppers[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:272.
- [29] LI J J, PANDEYA D, JO Y D, et al. Reduced activity of ATP synthase in mitochondria causes cytoplasmic male sterility in chili pepper[J]. Planta, 2013, 237(4):1097-1109.
- [30] WEN J F, ZHAO K, LV J H, et al. *Orf165* is associated with cytoplasmic male sterility in pepper[J]. Genetics and Molecular Biology, 2021, 44(3):e20210030.
- [31] WANG P, LU Q H, AI Y X, et al. Candidate gene selection for cytoplasmic male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.) through whole mitochondrial genome sequencing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3):578.
- [32] 郭金菊.辣椒细胞质雄性不育花药的蛋白质组学分析及 *CaSEP5* 基因的功能分析[D].北京:中国农业大学,2018.
- [33] TANG H W, LUO D P, ZHOU D G, et al. The rice restorer *Rf4* for wild-abortive cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial- localized PPR protein that functions in reduction of *WA352* transcripts[J]. Molecular Plant, 2014, 7(9):1497-1500.
- [34] HUANG W C, YU C C, HU J, et al. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(48): 14984-14989.
- [35] QIN X E, TIAN S K, ZHANG W L, et al. The main restorer Rf3 of maize S type cytoplasmic male sterility encodes a PPR protein that functions in reduction of the transcripts of orf355[J]. Molecular Plant, 2021, 14(12):1961-1964.
- [36] NIE Z X, SONG Y P, WANG H, et al. Fine mapping and gene analysis of *restorer-of-fertility* gene *CaRf*_{HZ} in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14):7633.
- [37] MANNA S. An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications[J]. Biochimie, 2015, 113:93-99.
- [38] GULYAS G, PAKOZDI K, LEE J S, et al. Analysis of fertility restoration by using cytoplasmic male-sterile red pepper (*Capsicum annuum* L.) lines[J]. Breeding Science, 2006, 56 (3): 331-334.
- [39] WANG L H, ZHANG B X, LEFEBVRE V, et al. QTL analysis of fertility restoration in cytoplasmic male sterile pepper[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(5):1058-1063.
- [40] KIM Y M, JO Y D, KWON J K, et al. Characterization and inheritance of a novel thermo-sensitive restoration of cytoplasmic male sterility in *Capsicum annuum*[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 164:512-520.
- [41] ZHANG B X, HUANG S W, YANG G M, et al. Two RAPD

- markers linked to a major fertility restorer gene in pepper[J]. Euphytica, 2000, 113(2):155-161.
- [42] MIN W K, LIM H, LEE Y P, et al. Identification of a third haplotype of the sequence linked to the *Restorer- of-fertility (Rf)* gene and its implications for male-sterility phenotypes in peppers (*Capsicum annuum* L.)[J]. Molecules and Cells, 2008, 25 (1):20-29.
- [43] JOYD, HAY, LEE JH, et al. Fine mapping of *Restorer-of-fer-tility* in pepper (*Capsicum annuum* L.) identified a candidate gene encoding a pentatricopeptide repeat (PPR)-containing protein[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129 (10): 2003-2017.
- [44] ORTEGA F A, BARCHENGER D W, WEI B Q, et al. Development of a genotype-specific molecular marker associated with restoration-of-fertility (*Rf*) in chile pepper (*Capsicum annuum*)[J]. Euphytica, 2020, 216(3):1-10.
- [45] KANG M C, KANG H J, JUNG S Y, et al. The unstable restorer-of-fertility locus in pepper (Capsicum annuum L.) is delimited to a genomic region containing PPR genes[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2022, 135(6): 1923-1937.
- [46] CHENG J W, CHEN Y J, HU Y F, et al. Fine mapping of *restor-er-of-fertility* gene based on high-density genetic mapping and collinearity analysis in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133(3):889-902.
- [47] WU L, WANG P, WANG Y H, et al. Genome-wide correlation of 36 agronomic traits in the 287 pepper (*Capsicum*) accessions obtained from the SLAF- seq- based GWAS[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22):5675.
- [48] 于海龙,任文静,方智远,等.蔬菜细胞质雄性不育的育性恢复研究进展[J].园艺学报,2021,48(5):1031-1046.
- [49] 吕庆雪,于彩虹,李毅丹,等.浅析玉米杂交制种技术[J].分子植物育种,2018,16(12):4037-4042.
- [50] 魏兵强,张淼,王兰兰,等.辣椒胞质雄性不育及其育性恢复研究进展[J].生物技术通报,2016,32(4):1-5.
- [51] LIU F, ZHAO J T, SUN H H, et al. Genomes of cultivated and wild *Capsicum* species provide insights into pepper domestication and population differentiation[J]. Nature Communications, 2023,14(1):5487.
- [52] LIAO Y, WANG JT, ZHU ZS, et al. The 3D architecture of the pepper genome and its relationship to function and evolution[J]. Nature Communications, 2022, 13(1):3479.