

吴明基, 刘华清, 陈建民, 等. 不同水稻 *tms5* 突变位点对雄性不育起点温度的影响 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (7): 761–771.
WU M J, LIU H Q, CHEN J M, et al. Critical Sterility-inducing Temperature of Rice Affected by *tms5* Mutation Site [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (7): 761–771.

不同水稻 *tms5* 突变位点对雄性不育起点温度的影响

吴明基, 刘华清, 陈建民, 付艳萍, 杨绍华, 宋亚娜, 林艳, 王峰*

(福建省农业科学院生物技术研究所/福建省农业遗传工程重点实验室, 福建 福州 350003)

摘要:【目的】研究不同水稻 *tms5* 突变位点对雄性不育起点温度的影响, 探讨不育起点温度遗传调控途径。
方法在水稻 *TMS5* 的 6 个外显子上设计 11 个 CRISPR/Cas9 基因编辑靶点, 依次命名为 T501—T511, 构建相应载体转化粳稻品种日本晴和籼稻品种明恢 86, 获得各靶点的 *tms5* 移码突变体。田间自然高温及人工气候箱(设日平均 22、24 和 28 °C 3 种温度)条件下分析 *tms5* 突变体的花粉碘染及自交结实率, 鉴定不育起点温度。**结果**粳稻日本晴 *tms5* 突变体的不育起点温度高于 28 °C, 籼稻明恢 86 的不同 *tms5* 突变体不育起点温度为 22~28 °C。此外, 同一遗传背景下, 通过 T501 靶点编辑产生的 *tms5-1* 移码突变体不育起点温度均显著高于 T502 靶点的 *tm5-2* 突变体, 其他位点上的 *tms5* 突变体育性特征与 *tm5-2* 突变体并无差异。基因表达量分析表明, *tms5-1* 突变体幼穗 *UbL40* 基因表达量显著低于 *tm5-2* 突变体的表达量。**结论**水稻 *tms5* 突变体不育起点温度不仅受遗传背景的影响, *tms5* 基因突变位点不同也会影响不育起点温度, 特别是 T501 位点与其余位点突变体间不育起点温度差异显著, 为研究水稻 *tms5* 两系不育起点温度的分子机理及遗传调控网络提供了新思路。

关键词: 水稻; CRISPR/Cas9; *TMS5*; 温敏核不育; 不育起点温度

中图分类号: S511

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 07-0761-11

Critical Sterility-inducing Temperature of Rice Affected by *tms5* Mutation Site

WU Mingji, LIU Huaqing, CHEN Jianmin, FU Yanping, YANG Shaohua, SONG Yana, LIN Yan, WANG Feng*

(Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Key Laboratory of Agricultural Genetic Engineering, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract:【Objective】Effects of *tms5* mutation site and related genetic regulatory factors in rice on the critical sterility-inducing temperature (CSIT) of the plant were investigated.【Method】Eleven CRISPR/Cas9 sequentially numbered T501 through T511 were designed to target 6 exons of *tms5* to create mutants of Nipponbare (NIP, *Oryza sativa* ssp. Geng) and Minghui 86 (MH86, *O. sativa* ssp. Xian). Pollen male fertility and seed setting rate of the mutants were monitored under long day and high temperature field conditions in early August in Fuzhou (NHT) or at 22, 24, and 28 °C in phytotrons to identify the CSIT.【Result】The CSIT of the NIP mutants were higher than 28 °C, while that of the MH86 mutants between 22 °C and 28°C. The *tms5-1* T501 mutant had a significantly higher CSIT than the genetically identical *tms5-2* counterparts T502, but the other 9 *tm5* and the *tm5-2* mutants did not differ on it. Expressions of the 3 *UbL40* in young panicles were lower in the *tms5-1* than the *tm5-2* mutants of either rice varieties.【Conclusion】It appeared that the CSIT of *tms5* mutants was affected by the genetic factors as well as the mutation site as the *tms5-1* mutant T501 was shown significantly differed from the others.

Key words: Rice; CRISPR/Cas9; *TMS5*; thermo-sensitive genic male sterility; critical sterility-inducing temperature

0 引言

【研究意义】当前水稻生产上利用的光温敏雄

性核不育系(两系不育系)具有长日高温不育、短日低温可育的特点, 但育性表达不稳定, 不育起点温度存在“遗传漂变”现象^[1-5], 目前对于不育起点温

收稿日期: 2023-05-12 修回日期: 2023-05-22

作者简介: 吴明基(1976—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事水稻遗传育种研究, E-mail: 839845032@qq.com

*通信作者: 王峰(1963—), 男, 博士, 研究员, 主要从事水稻基因工程与遗传育种研究, E-mail: wf@fjage.org

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2020J011359); 福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目(XTCXGC2021002); 福建省科技重大专项(2020NZ08017)

度的遗传解析进展缓慢，因此创制并利用新型材料对不育起点温度进行研究具有重要意义。【前人研究进展】前人研究表明，在不同遗传背景下，由同一个核不育基因控制的两系不育系可表现出显著的不育起点温度差异^[3-5]；另一方面，同一遗传背景下，不同世代间及同一世代不同单株间的不育系材料也会表现出不育起点温度的遗传漂变现象^[3-5]。近年来，研究者已经成功克隆了 *Photoperiod-sensitive Male Sterility-1 (PMS1)*^[6]、*Photoperiod-sensitive Male Sterility-3 (PMS3)*^[7-8]、*Thermosensitive Male Sterility-5 (TMS5)*^[9]、*Thermosensitive Male Sterility-10 (TMS10)*^[10]、*Carbon Starved Anther (CSA)*^[11] 和 *Male Sterile1 (MS1)*^[12-13] 等多个决定水稻光/温敏核不育性状的基因，可以更加深入了解光温条件控制水稻育性转换的分子机制。其中，*tms5* (LOC_Os02g12290) 基因在当前两系杂交稻生产上应用最为广泛^[9,14]，TMS5 通过调控 *UbL40* 基因在花粉母细胞中的表达量控制水稻花粉发育。在高温条件下，水稻 *tms5* 突变体 *UbL40* mRNA 表达量增高，可导致水稻花粉败育，但低温条件下，*UbL40* mRNA 表达量较低，并不影响花粉正常发育，这一机制决定了 *tms5* 水稻高温不育和低温可育的育性转换温敏特性^[9]。Tan 等^[14] 发现 TMS5 基因的 cds.71 是一个突变热点，在绝大部分已育成的两系不育系中，温敏雄性不育性都由 TMS5 第 71 位碱基从 C 到 A 的单一突变基因型决定^[9]。前人研究认为，不同 *tms5* 不育系间的雄性不育起点温度差异，由不同遗传背景决定，与 *tms5* 突变基因本身无关^[15,16]。Zhou 等^[15] 利用 CRISPR/Cas9 对 11 个水稻品种的 TMS5 位点进行编辑，所获得的 *tms5* 不育系中，大多数不育系的不育起点温度符合水稻两系不育系育种的生产实际要求 (23~24 °C)，但少数材料不育起点温度较高，不能适应生产实际需求。Barman^[17]、吴明基^[18]、陈日荣^[16]、黄忠明^[19]、杜茜^[20]、Fang^[21] 和梁敏敏^[22] 等也利用 CRISPR/Cas9 对多个籼稻或粳稻品种 TMS5 位点进行编辑，发现粳稻背景的 *tms5* 突变体育性起点温度显著高于籼稻背景的 *tms5* 突变体，此外，不同籼稻 *tms5* 突变体间的不育起点温度也并不相同。【本研究切入点】从目前已有的有关水稻 *tms5* 突变体的研究看，不同的研究者均观察到 *tms5* 突变体不育起点温度受不同遗传背景的影响，但对其具体的作用机制尚缺少深入了解。【拟解决的关键问题】本研究构建 11 个 CRISPR/Cas9-TMS5 基因编辑载体，靶向水稻 TMS5 基因不同位置，利用这些载体转化粳稻品种日本晴和籼稻品

种明恢 86，获得各靶点上的 *tms5* 移码突变体，分析这些突变体的育性转换特征，以期为水稻 *tms5* 不育起点温度分子调控机制的研究提供新材料与新思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻材料为籼稻品种明恢 86 与粳稻品种日本晴。试验所用引物的合成及 PCR 产物测序均由铂尚生物技术（福州）有限公司完成，其他试剂为实验室通用试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 载体构建及遗传转化

水稻温敏核不育基因 TMS5 共有 6 个外显子，利用 <http://www.e-crispr.org/> 生物信息学网站设计 CRISPR/Cas9 靶点，在 TMS5 第一外显子处设计了 5 个靶点，第二外显子处设计了 2 个靶点，其余 4 个外显子处各设计了 1 个靶点，各靶点依次命名为 T501—T511，总共合成 11 对 sgRNA 靶序列（表 1）。利用北京唯尚立德生物技术公司提供的 VK005-1 载体快速构建试剂盒，共构建 11 个 CRISPR/Cas9-TMS5 基因编辑载体，依次命名为 TMS501—TMS511，将这些基因编辑载体转化到根癌农杆菌 LBA4404 中，利用农杆菌介导的方法转化日本晴与明恢 86，通过筛选鉴定，获得相应载体的转基因水稻，具体步骤参照苏军等^[23] 的方法。

1.2.2 基因型鉴定

使用 CTAB 法^[24] 从 T₀、T₁ 和 T₂ 世代各单株的水稻叶片中提取基因组 DNA，通过 PCR 扩增潮霉素磷酸转移酶基因 (HPT) 鉴定转基因阳性植株。设计并合成引物 TMS5F 与 TMS5R（表 2），通过 PCR 扩增出 T₀、T₁ 和 T₂ 代各植株的 TMS5 基因组片段。具体鉴定步骤参照吴明基等^[18] 的方法。获得的 PCR 产物由铂尚生物技术（福州）有限公司进行 Sanger 测序，鉴定各靶点 *tms5* 突变情况，通过 T₀ 代自交分离，于 T₁ 代筛选出两条染色体上突变类型相同的纯合移码突变体单株，用于花粉育性鉴定。

1.2.3 材料种植管理与光温处理

2017—2019 年，在福州寿山试验基地（北纬 26°08'，东经 119°28'，海拔 400 m）种植明恢 86、日本晴及这两个品种的 *tms5* 突变体。2017 年于温室种植 T₀ 代。2018 年种植 T₁ 代，在明恢 86 和日本晴背景下，每一个靶点的 *tms5* 突变体各选择 3 个来源于独立克隆的 T₁ 代株系进行大田种植。因明恢 86 背景的材料生育期较长，于 5 月 20 日播种，日本晴来源的生育期较短，于 6 月 20 日播种。秧苗 25 d 秧龄

表1 本试验所用 sgRNA 序列
Table 1 sgRNA applied

靶位点 Target	序列 (5'-3') Sequence	试验目的 Purpose
T501S	CAGGAACAGCGGCAAGTCATCGC	sgRNA构建/
T501A	AACCGCATGACTTGCCGCTGTT	sgRNA Construction
T502S	CAGCCACCGCGCCGCCACCGGGT	sgRNA构建/
T502A	AACACCCGGTGGCGCGCGGTGG	sgRNA Construction
T503S	CAGCACCGTCGAGGGCTACCCCG	sgRNA构建/
T503A	AACCAGGGTAGCCCTGACGGTG	sgRNA Construction
T504S	CAGCCCAGTACGTCGCCACCCG	sgRNA构建/
T504A	AACCGGGTAGGCACGTACATGGG	sgRNA Construction
T505S	CAGAACCTCGTCCCCCTCGAGAT	sgRNA构建/
T505A	AACATCTCGAGGGGGACGAGGTT	sgRNA Construction
T506S	CAGGTAGGGGTATGTGATATACA	sgRNA构建/
T506A	AACTGTATATCACATACCCCTAC	sgRNA Construction
T507S	CAGATCAAGCAGCTGAAGCTGTC	sgRNA构建/
T507A	AACGACAGCTTCAGCTGCTTGAT	sgRNA Construction
T508S	CAGTGCTTTACCGGAGATAACGA	sgRNA构建/
T508A	AACTCGTATCTCCGGTAAAAGCA	sgRNA Construction
T509S	CAGTGGGCACACCCATCTGTTG	sgRNA构建/
T509A	AACCAAACAGATGGGTGTGCCCA	sgRNA Construction
T510S	CAGTTCTGCTCGTTACCGCAG	sgRNA构建/
T510A	AACCTGCGGTATAACGAGCAGAA	sgRNA Construction
T511S	CAGAAGTAGAGTTCATGCATTG	sgRNA构建/
T511A	AACTCAATGCATGAACCTACTT	sgRNA Construction

时移栽到大田，单本种植，每份材料各种 100 株。2019 年种植 T₂ 代材料，播种时间与 2018 年相同。两个背景下选择 T501 和 T502 靶点突变体材料各 3 个克隆进行盆栽及大田种植，其中盆栽材料每份 15 盆，每盆 1 株，用于人工气候箱育性鉴定。大田或盆栽材料均采取正常田间水肥管理与病虫害防治。T₀ 和 T₁ 代不育株进行割兜再生，在幼穗分化敏感期利用寿山基地秋季自然低温或人工气候箱日均 22 ℃ 低温处理，抽穗后移到温室套袋收种。得到的 *tms5* 纯合突变株用于后续的花粉育性观察与鉴定。

1.2.4 花粉育性鉴定

(1) 田间自然条件育性鉴定

福州 8 月中旬田间环境下，当 *tms5* 突变体及野生型亲本抽穗时，采集即将开花小穗的上、中、下各 2 朵颖花制片，用 1% 的 I₂-KI 对花粉进行染色，通过显微镜观察，统计花粉黑染率。套袋 10 株，25 d

表2 供试引物
Table 2 Primers selected

引物名 Primer name	序列 Sequence (5'-3')	试验目的 Purpose
HptF	AGGTCAGGCTCTCGCTAAC	转基因阳性株检测/ Identify transgenic plants
Hpt-R	ACGTAAGGGATGACGCACAAT	
TMS5F	CCATCGTCTTCGTCCA	<i>TMS5</i> 基因扩增、测序 PCR and Sanger sequence for <i>TMS5</i>
TMS5R	GAGTTCTGGTACATGAGTGC	
UBL401F	CTACCCCAAGGGGATCGAG	Real-Time PCR
UBL401R	GCAAGGCGGTGATTGAAC	
UBL402F	TCGCTCAGGGTCTCGCTA	Real-Time PCR
UBL402R	CTAGATTCGGCATCCAGTAG	
UBL404F	TACACCATCCAGGAGCCCA	Real-Time PCR
UBL404R	GGTAGCTGGCATAACGAAG	
ActinF	CGTCTGCGATAATGGAAC	Real-Time PCR
ActinR	TCTGGGTATCTTCACGA	

后随机选择 10 穗调查自交结实率。

(2) 人工气候箱育性鉴定

当盆栽 *tms5* 突变体稻株及野生型亲本主茎处于幼穗分化第四期时，将盆栽植株移入人工气候箱（加拿大 Conviron 公司）进行不同温度处理，同一温度条件下，每份材料处理 5 盆。不同温度处理设置为日平均 22 ℃、24 ℃ 和 28 ℃ 3 种温度条件，光照时长均为 14.5 h，具体光温处理条件设置参照吴明基等^[18]的方法。处理 7 d 后，将供试材料移出人工气候箱，用记号笔标记叶枕距约 ±1 cm 的稻穗，待抽穗后调查花粉黑染率，并将调查的稻穗套袋，种子成熟后计算结实率，得到的花粉黑染率及结实率数据经反正弦平方根转换后作方差分析。

1.2.5 *UbL40* 表达量检测

明恢 86 及日本晴来源的 T501 和 T502 靶点突变体材料经人工气候箱 24 ℃ 和 28 ℃ 处理结束 7 d 后，快速剥取 3~5 个处于花粉母细胞形成期到花粉母细胞减数分裂期的幼穗（长约 3 cm），迅速放入液氮罐内储存，每份材料各取样 3 个重复。提取每份样品的 RNA，用 2 μg 总 RNA 作模板，使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒（Thermo Scientific, UC, Lithuania）合成 cDNA。以合成的 cDNA 作模板，在 QuantStudio3 实时荧光定量 PCR 系统（ThermoFisher Scientific, Singapore）上用 ChamQTM SYBR qPCR Master Mix (Vazyme Biotech, Nanjing, China) 进行实时定量 RT-PCR，以水稻 *Actin* 为内参，通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ^[9] 计算 *UbL40*1、*UbL40*2

和 $Ub_{L40}4$ 基因的相对表达水平。所有试验进行3次技术重复。用于基因表达量分析的不同引物名称及序列列于表2。

2 结果与分析

2.1 不同 *TMS5* 基因编辑载体的靶向突变效率分析

构建11个CRISPR/Cas9-TMS5基因编辑载体TMS501-TMS511，通过农杆菌介导方法将这11个载体转入明恢86与日本晴的愈伤组织，获得各载体转化的T₀代水稻幼苗，经PCR检测潮霉素抗性基因，获得阳性转基因植株（表3）。利用特异性引物（表2）扩增11个TMS5靶点的目的序列并进行测序。测序

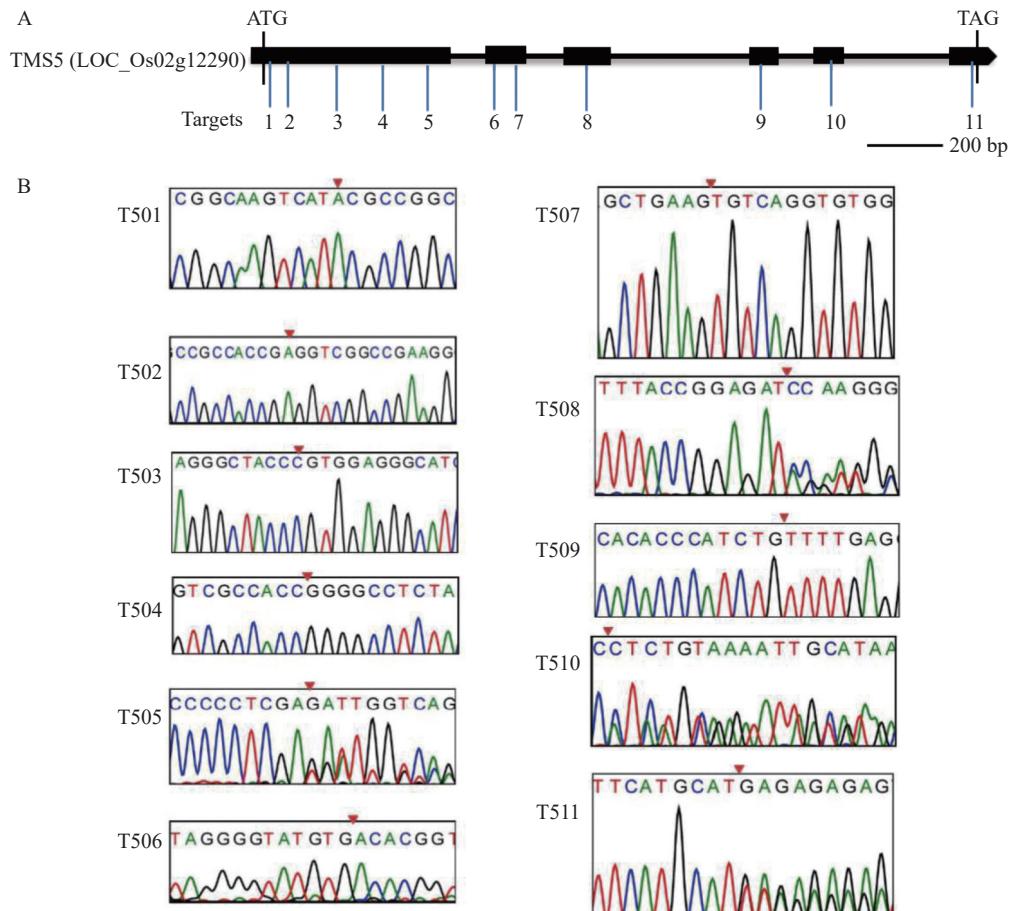
结果分析发现，明恢86和日本晴遗传背景的所有11个靶点转基因T₀代，都在靶点位置发生了碱基的插入或缺失突变（表3、图1）。其中，TMS508和TMS510载体诱导的突变效率较低，仅有10%~13.3%；而TMS501、TMS502、TMS506、TMS509和TMS511等5个载体诱导的突变率均高于65%，可以作为TMS5的候选基因编辑靶点，进行水稻两系不育系定向创制。收获T₀代种子，T₁代继续进行突变位点鉴定，得到的tms5纯合突变株用于后续的花粉育性观察与鉴定。

2.2 tms5突变体田间育性鉴定

所有T₁代材料于8月15—20日开始抽穗，观察鉴定所有突变体的花粉育性特征（图2）。T501

表3 各载体转化T₀代植株突变分析
Table 3 Mutation of T₀ transgenic plants

载体 Construct	靶点位置 Target site	品种 Variety	转基因植株数 Numbers of transgenic plants	含突变植株数 Numbers of mutation plants	突变率 Mutation rates/%
TMS501		Nipponbare	21	15	71.4
		MH86	18	16	88.9
TMS502		Nipponbare	22	21	95.5
		MH86	11	11	100.0
TMS503	<i>TMS5</i> 第一外显子 First exon of <i>TMS5</i>	Nipponbare	29	11	37.9
		MH86	9	6	33.3
TMS504		Nipponbare	21	11	52.4
		MH86	15	7	46.7
TMS505		Nipponbare	21	6	28.6
		MH86	21	7	33.3
TMS506		Nipponbare	19	13	68.4
		MH86	24	21	87.5
TMS507	<i>TMS5</i> 第二外显子 2nd exon of <i>TMS5</i>	Nipponbare	10	2	20.0
		MH86	11	1	9.1
TMS508	<i>TMS5</i> 第三外显子 3rd exon of <i>TMS5</i>	Nipponbare	10	1	10.0
		MH86	18	2	11.1
TMS509	<i>TMS5</i> 第四外显子 4th exon of <i>TMS5</i>	Nipponbare	21	14	66.6
		MH86	18	13	72.2
TMS510	<i>TMS5</i> 第五外显子 5th exon of <i>TMS5</i>	Nipponbare	10	1	10.0
		MH86	15	2	13.3
TMS511	<i>TMS5</i> 第六外显子 6th exon of <i>TMS5</i>	Nipponbare	14	12	85.7
		MH86	11	9	81.8



A: *TMS5* 基因结构的示意图, 黑色矩形代表 *TMS5* 的 6 个外显子, 图中短竖线所指位置为各靶点在 *TMS5* 基因上的位置。B: CRISPR/Cas9 介导的 *TMS5* 突变实例, 每个靶点只列出了一种突变类型, T505、T508、T510 靶点列出的是杂合型突变, T511 靶点是双突变, 其余位点列出的均为纯合型突变; 图上三角形处为缺失或插入突变发生的位置。

A. Schematic *tms5* structure; black rectangles represent 6 exons of *tms5*; short vertical line refers to position of each target. B. CRISPR/Cas9-mediated *tms5* mutants; only one mutation type is listed for each target; T505, T508, and T510 are listed as heterozygous mutations; T511 as biallelic mutation; and remainders as homozygous mutations; triangles point at deletion and insertion sites.

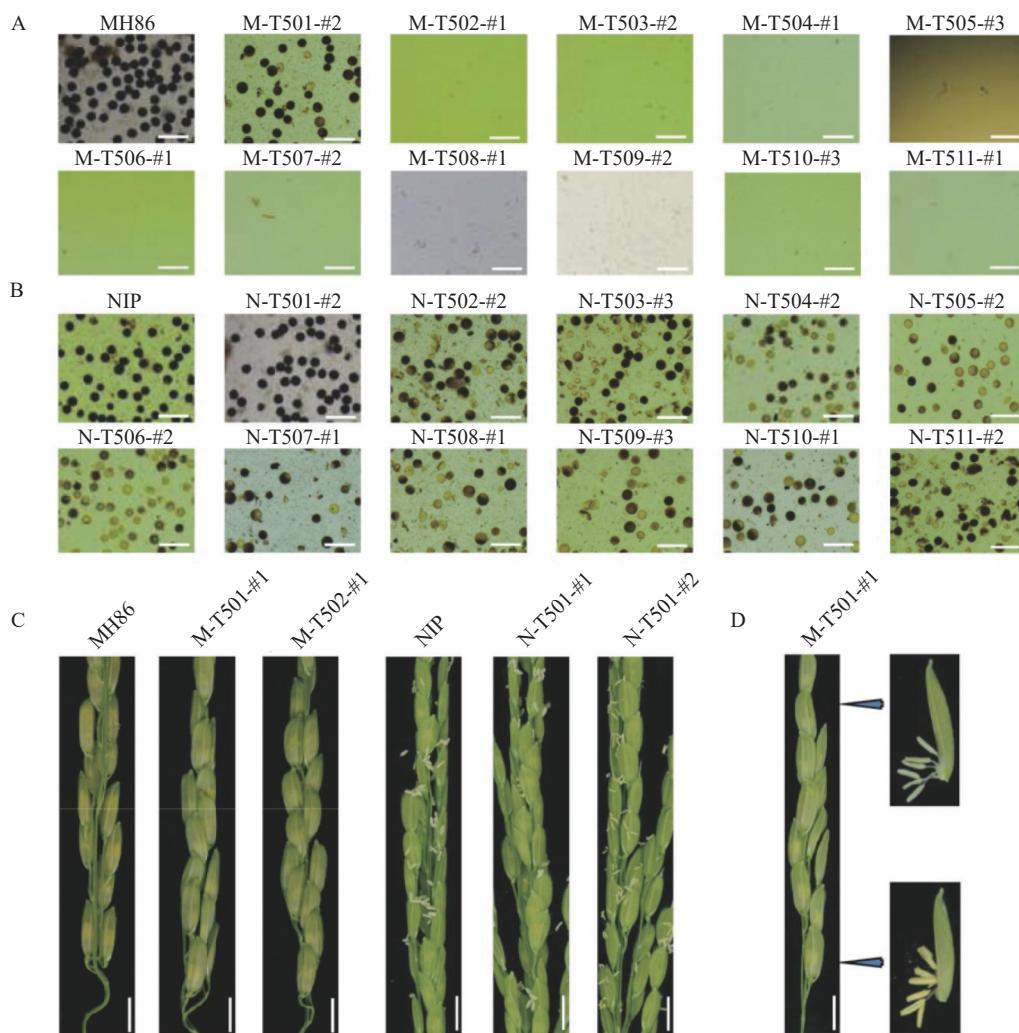
图 1 CRISPR/Cas9 系统介导的 *TMS5* 基因特异性突变

Fig. 1 CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *tms5*

与 T502 靶点产生的突变体以下分别简称为 *tms5-1* 突变体与 *tms5-2* 突变体。日本晴遗传背景的 *tms5-1* 突变体(依据不同纯合突变基因型, 分别命名为 N-T501-#1, -#2, -#3, 各纯合移码突变基因型列于表 4, 均表现花药较黄且肥大, 多数花药能够正常开裂并散粉, 镜检可见大量黑染花粉。而日本晴 *tms5-2* 突变体(依据不同纯合突变基因型, 分别命名为 N-T502-#1, -#2, -#3)及其他 9 个靶点的突变体均表现出不同程度的育性分离, 在不同稻穗间及同一稻穗上可同时观察到可育和不育特征的颖花, 育性极不稳定。来源于明恢 86 遗传背景的 *tms5-1* 突变体(依据不同纯合突变基因型, 分别命名为 M-T501-#1, -#2, -#3)育性也表现出穗上和穗间分离特征, 类似于日本晴 *tms5-2* 突变体。而来源于明恢 86 其他靶点的 *tms5* 突变体则彻底不育, 镜检结果为无花粉型(图 2)。

将每个突变体套袋, 种子成熟后随机统计 10 穗

的结实率列于表 4。因同一背景下 T502—T511 各靶点产生移码突变体的育性特征相似(图 2), 所以只采用 T502 与 T511 靶点突变体的结实率数据进行统计分析。从表 4 可知, 野生型明恢 86 和日本晴结实率分别为 87.5% 与 89.5%, 自交结实率基本正常, 所有 *tms5* 突变体的结实率都低于野生型亲本, 其中, 日本晴 *tms5-1* 突变体结实率为 44.1%~54.2%, 未发现完全不结实的稻穗。而其他靶点的日本晴 *tms5* 突变体出现完全不结实与部分结实稻穗共存的现象。由于不同稻穗的结实率差异明显, 导致结实率方差分析结果出现标准差大于平均数的情况(表 4)。明恢 86 遗传背景的 *tms5-1* 突变体植株也存在部分结实与完全不育的稻穗, 与日本晴背景下的 T502-T511 靶位点的突变体表现相似, 明恢 86 背景 T502-T511 靶点突变体的套袋稻穗则完全不结实(表 4)。



①A和B: 明恢86(A)及日本晴(B)遗传背景的 $tms5$ 突变体 T_1 代材料花粉育性; 两种背景的 $tms5$ 突变体(依次为T501至T511靶点突变)育性敏感期处于福州8月初的自然长日高温条件; MH86为明恢86, NIP为日本晴; M-#和N-#分别代表明恢86和日本晴遗传背景的突变体。C: 明恢86和日本晴两种遗传背景的野生型、 $tms5$ -1突变体及 $tms5$ -2突变体穗部开花特征。D: M-T501-#1同一穗上出现可育与不育的颖花。②标尺长度: 80 μm(A、B), 0.5 cm(C、D)。

①A and B: Pollen fertility of $tms5$ mutants in MH86 (A) and NIP (B) induced at 11 targets from T501 to T511; NHT was in early August in Fuzhou; M-# and N-# are mutant plants of MH86 and NIP, respectively. C: Flowering characteristics of WT, $tms5$ -1, and $tms5$ -2 mutants of NIP and MH86 backgrounds. D: Both fertile and sterile spikelets were set on same panicle of M-T501-#1. ②Scale bars represent 80 μm for A and B, 0.5 cm for C and D.

图2 T_1 代 $tms5$ 突变体在田间高温下的花粉育性

Fig. 2 Pollen fertility of T_1 $tms5$ mutants under NHT

综上所述, 在福州寿山试验基地8月中旬田间自然条件下, 日本晴遗传背景的 $tms5$ 突变体存在较高比例的花粉黑染及自交结实率, 不能完全转为雄性不育系, 但T501靶位点突变体与T502等其他靶位点突变体的育性有所不同, T501靶位点突变体的花粉黑染及自交结实率较T502等其他靶位点突变体的高。来源于明恢86遗传背景的 $tms5$ -1突变体表现部分不育, 但在相同环境条件下, T502等其他10个靶点的 $tms5$ 突变体则表现完全不育。这一结果表明, 日本晴与明恢86两种不同遗传背景的 $tms5$ 突变体的育性表现并不相同, 其中日本晴 $tms5$ 突变体的花粉败育程度低于明恢86 $tms5$ 突变体。此外, 日本

晴与明恢86两个遗传背景的 $tms5$ -1突变体花粉育性及结实率都高于其他靶点产生的突变体。日本晴和明恢86两种背景下的 $tms5$ 花粉败育程度的不同, 可能是 $tms5$ 突变体不育起点温度不同引起的, 这与相关文献报道^[16-20]的一致。但在两种遗传背景下, T501靶位点突变体的花粉黑染及自交结实率与T502等其他靶位点突变体的不同, 这一现象尚未见报道, 是否也与 $tms5$ 突变体不育起点温度有关, 尚待进一步利用人工气候箱进行分析。

2.3 $tms5$ 突变体人工气候箱育性鉴定

2019年8月, 福州寿山田间自然条件下, T_2 代材料的育性表现与 T_1 代类似, 日本晴与明恢86两种

表 4 T_1 代 *tms5* 材料结实率
Table 4 Seed setting rates of T_1 generation of *tms5* mutants

背景 Background	材料 Lines	突变序列 §Mutation sequences	平均结实率 †Average seed setting rates/%
明恢86 MH86	MH86		87.5±4.3 a
	M-T501-#1	T501gaacagggcaagtcatAcgccgg	6.9±9.6 b
	M-T501-#2	T501gaacagggcaagtcatTgcccgg	4.0±5.6 b
	M-T501-#3	T501gaacagggcaagtcatCgcccgg	5.4±6.9 b
	M-T502-#1	T502ccacccgcgc-----ggtc	0 c
	M-T502-#2	T502ccaccgcgcgcaccgCggcgg	0 c
	M-T502-#3	T502ccaccgcgcgcaccgTggcgg	0 c
	M-T511-#1	T511gttagagttcatgcataaaggaa	0 c
	M-T511-#2	T511gttagagttcatgcataTtgaaggaa	0 c
	M-T511-#3	T511gttagagttcatgcataAtgaaggaa	0 c
日本晴 Nipponbare	Nipponbare		89.5±2.0 a
	N-T501-#1	T501gc-----gacc	48.9±22.1 c
	N-T501-#2	T501gaacacggcaagtca--gcccgg	54.2±15.8 b
	N-T501-#3	T501gaacagggcaagtcatTgcccgg	44.1±12.2 c
	N-T502-#1	T502ccaccgcgcgc-----Cggcggc	10.1±10.2 d
	N-T502-#2	T502ccaccgcgcgcaccgAggtcgcc	8.8±10.1 d
	N-T502-#3	T502ccaccgcgcgcaccgTggcgg	9.4±9.6 d
	N-T511-#1	T511gttagagttcatgcataaaggaa	9.6±8.4 d
	N-T511-#2	T511gttagagttcatgcataCtgaaggaa	10.6±10.0 d
	N-T511-#3	T511gttagagttcatgcataAtgaaggaa	10.4±8.9 d

①§靶点位置的大写字母和短划线分别表示插入与缺失突变类型。②†结实率为10穗结实率的平均值±标准差。③同列数据后不同小写字母表示依据LSD多重比较，同一遗传背景材料间的差异达显著水平($P<0.05$)，下同。

④§ Capital letters and dashes at target sites indicate type of insertion and deletion mutations, respectively. ⑤† Average seed setting rates are mean ± standard deviation calculated from 10 panicles. ⑥ Data with different lowercase letters on same column indicate significant difference according to LSD multiple comparison ($P<0.05$). Same for below.

遗传背景的 *tms5-1* 突变体花粉可育性都高于 *tms5-2* 突变体(表 5, 图 3)。利用人工气候箱 22、24 和 28 ℃ 进行育性鉴定结果表明, 随着处理温度升高, *tms5* 突变体的可育花粉数量减少, 结实率降低(表 5、图 3)。其中, 明恢 86 的 *tms5-2* 突变体只在 22 ℃ 条件下出现黑染花粉, 黑染率为 9.3%~13.9%, 结实率为 1.5%~1.9%, 在其他条件下都表现完全不育, 说明了明恢 86 的 *tms5-2* 突变体不育起点温度约为 22 ℃。然而, 明恢 86 的 *tms5-1* 突变体在 24 ℃ 处理后仍有大量可育花粉, 自交结实率为 30.7%~41.4%, 不育起点温度高于 24 ℃, 这类材料在 28 ℃ 条件下才表现完全不育。日本晴的两类 *tms5* 突变体育性表现也有类似规律, 但 *tms5-1* 突变体在 28 ℃ 条件下仍然表现较高的花粉黑染率(35.1%~40.1%)与自交结实率(13.1%~18.6%), 并未出现完全不育。这一结果表明水稻 *tms5* 不育系的不育起点温度除了受到不同遗传背景调控影响外, T501 位点的特异序列变异也与 *tms5* 不育系的起点温度有关。

2.4 *Ub_{L40}* 基因的差异表达分析

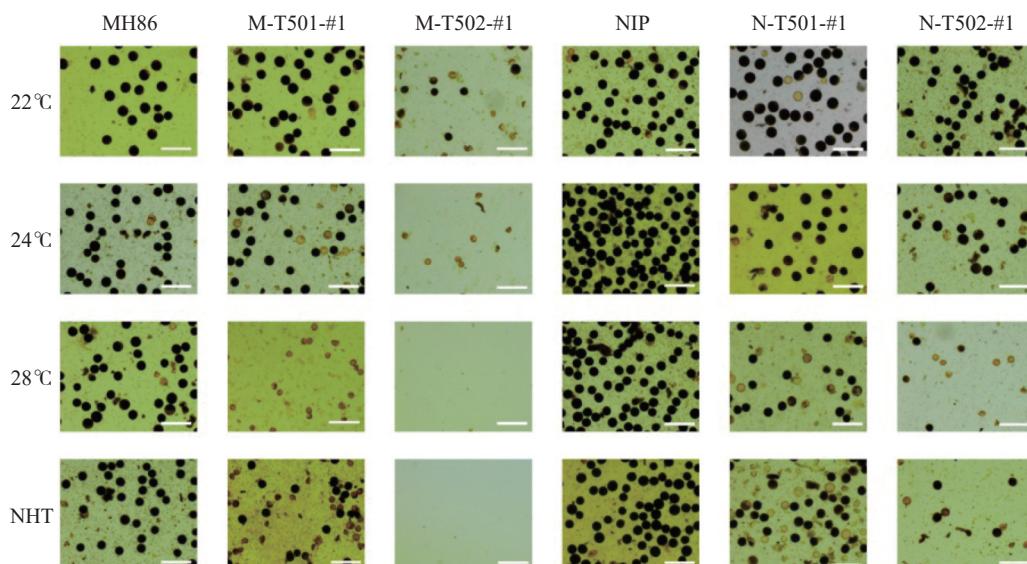
通过 Real-Time PCR 检测了明恢 86 和日本晴背景的野生型、*tms5-1* 突变体和 *tm5-2* 突变体各材料幼穗中 *Ub_{L40}1*、*Ub_{L40}2* 和 *Ub_{L40}4* 的表达水平(图 4)。结果显示, 明恢 86 和日本晴两种遗传背景的 *tms5* 突变体中每个 *Ub_{L40}* 基因的表达量在 28 ℃ 条件下均显著高于 24 ℃ 条件下的表达水平, 说明 *Ub_{L40}* 基因表达受温度调控, 表达量可随环境温度的增高而增加, 这些结果与前人的报道^[9,22]一致。此外, 相同温度条件下, *tms5-1* 突变体中 *Ub_{L40}* 的 mRNA 表达量均显著低于 *tm5-2* 突变体的表达量, 尤其在 28 ℃ 条件下, *Ub_{L40}* 基因在 *tm5-2* 突变体的表达量为最高水平, 在 *tms5-1* 突变体的表达量为中等水平, 在野生型对照的表达量最低(图 4)。由于水稻 *tms5* 突变体 *UbL40* mRNA 表达量增高, 可导致水稻花粉败育^[9], 因此 *tms5-1* 突变体与 *tm5-2* 突变体间不同的 *UbL40* 表达水平可能导致两类突变体在相同温度条件下表现出不同的育性特征。

表5 T_2 代 *tms5*突变体花粉育性及自交结实率
Table 5 Pollen fertility and seed setting rates of T_2 *tms5* mutants

植株编号 Plant ID	花粉黑染率 Stained pollens rate/%				自交结实率 Seed setting rate/%			
				自然条件 Natural condition				自然条件 Natural condition
	22 °C	24 °C	28 °C		22 °C	24 °C	28 °C	
MH86	86.7±7.8 a	87.1±6.9 a	87.2±5.8 a	88.3±7.1 a	83.4±8.7 a	83.1±6.4 a	85.2±7.2 a	85.9±6.5 a
M-T501-#1	87.5±10.3 a	61.6±13.5 c	0 b	20.5±11.5 c	67.8±20.3 b	30.7±12.3 c	0 b	8.5±10.6 c
M-T501-#2	80.1±12.0 b	62.7±10.4 c	0 b	28.2±16.3 b	65.3±16.5 bc	40.2±20.5 b	0 b	21.3±16.3 b
M-T501-#3	83.3±8.7 ab	71.2±20.2 b	0 b	25.6±15.6 bc	62.2±8.5 c	41.4±17.4 b	0 b	18.7±21.5 b
M-T502-#1	12.1±10.6cd	0 d	0 b	0 d	1.5±0.3 d	0 d	0 b	0 d
M-T502-#2	9.3±5.8d	0 d	0 b	0 d	1.8±0.6 d	0 d	0 b	0 d
M-T502-#3	13.9±10.1 c	0 d	0 b	0 d	1.9±1.3 d	0 d	0 b	0 d
Nipponbare	92.5±5.9a	90.6±7.3 a	91.1±6.3 a	92.5±6.5 a	87.6±8.2 a	88.1±9.3 a	87.8±6.6 a	90.5±2.3 a
N-T501-#1	84.2±5.7 b	78.2±20.4 b	35.1±11.3 c	67.4±6.9 c	84.1±8.3 a	66.4±10.6 b	13.1±7.2 c	45.2±33.1 c
N-T501-#2	86.2±19.5 b	80.2±12.9 b	37.1±8.8 bc	75.7±15.2 b	83.2±7.8 a	68.5±10.3 b	14.8±5.1 bc	52.1±35.8b
N-T501-#3	82.3±21.2 b	80.1±18.1 b	40.1±10.5 b	69.1±9.6 c	83.1±10.9 a	50.5±12.2 c	18.6±9.5 b	50.7±28.3 bc
N-T502-#1	82.2±6.8 b	70.0±20.2 c	6.1±2.5 d	25.2±19.0 e	72.3±9.2 bc	35.3±28.1 d	3.5±1.6 c	14.1±11.2 d
N-T502-#2	85.5±6.3 b	72.2±18.5 c	7.6±6.6 d	31.1±16.9d	75.8±12.3 b	33.4±16.9 d	7.5±8.1 c	18.6±10.3 d
N-T502-#3	84.1±9.2 b	70.5±16.7 c	9.2±8.1 d	26.3±27.7 e	69.6±9.2 c	25.4±20.3 e	4.2±2.5 c	17.6±16.3 d

花粉黑染率及自交结实率均为5株的平均值，自然条件指福州8月份的长日高温条件。

Data are means on 5 plants; NHT was defined as long day and high temperature in August in Fuzhou.



① 22 °C、24 °C、28 °C、NHT 分别表示明恢 86 及日本晴遗传背景的 *tms5-1* 及 *tms5-2* 突变体在人工气候箱 22 °C、24 °C、28 °C 及福州 8 月初自然高温条件下 (NHT) 的花粉育性。MH86 为明恢 86，NIP 为日本晴，M-# 和 N-# 分别代表明恢 86 和日本晴遗传背景的突变体。② 标尺长度：80 μm。

① Pollen fertility of *tms5-1* and *tms5-2* mutants of MH86 and NIP backgrounds cultivated at 22 °C, 24 °C or 28 °C in phytotrons, or under NHT, respectively; M-# and N-# represent mutant plants of MH86 and NIP backgrounds, respectively. ② Scale bars are 80 μm in length.

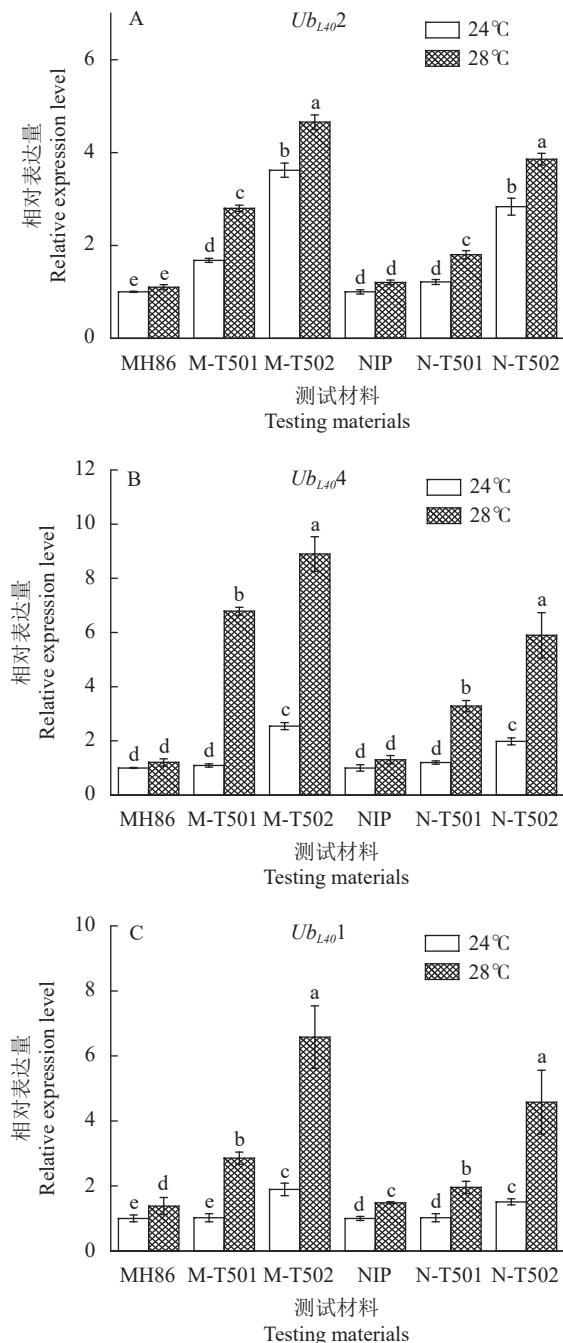
图3 T_2 代 *tms5*突变体在不同温度条件下的花粉育性

Fig. 3 Pollen fertility of T_2 *tms5* mutants under varied temperatures

3 讨论

两系杂交稻育种过程中，选育出低不育起点温

度的两系不育系对于生产合格的杂交稻种子至关重要，而当前生产上应用的 *tms5* 不育系表现出并不完全相同的不育起点温度，其遗传调控机制较为复杂^[2-5]。



A、B 和 C 分别表示明恢 86 及日本晴 *tms5* 突变体 *UbL40-1*、*UbL40-2* 和 *UbL40-4* 的表达特征，数据为平均数±标准差，n=3。

A, B and C: expressions of *UbL40-1*, *UbL40-2* and *UbL40-4* in *tms5* mutants of MH86 and NIP, respectively. Data are mean ± standard deviation calculated from 3 replicates.

图 4 *UbL40* 基因的表达量差异分析

Fig. 4 Differential expressions of *UbL40*

前人研究认为，多个微效基因间的互作决定了光温敏核不育水稻的不育起点温度，而遗传基础不纯可能是不育起点温度“遗传漂变”的内在原因^[3-5,25-26]。近年来，国内多个研究团队^[15-22]利用CRISPR/Cas9技术对多个籼稻与粳稻品种进行TMS5位点编辑，获得的大多数籼型不育系起点温度低于24℃，符合两

系不育系育种的实际需求，但所有粳型不育系起点温度高于26℃，有些材料甚至要在32℃条件下才能完全不育，这种育性特征不能适应两系稻育种的实际生产需求。以上结果说明不同的*tms5* 不育系材料因遗传背景的差异可表现出显著不同的温敏不育起点温度，粳稻材料不育起点温度过高，不能适应生产需求。周海、陈日荣、黄忠明等^[15-16,19]认为，不同*tms5* 不育系的雄性不育起点温度由不同水稻品种的遗传背景决定，与*tms5* 突变基因本身无关。

本研究通过对一系列*tms5* 突变体不育起点温度的分析发现，相同靶位点的*tms5* 突变体，粳稻背景下的*tms5* 突变体不育起点温度较籼稻的高，这与前人报道^[15-22]的一致。但本研究同时发现，在同一遗传背景下，不同靶位点突变体的不育起点温度也有所不同。无论在粳稻日本晴，还是在籼稻明恢86背景下，T501靶位点突变体(*tms5-1*)的不育起点温度显著高于T502等其他靶位点上产生的突变体的不育起点温度，这一新现象目前尚未见报道。进一步表达分析发现，在明恢86及日本晴背景下，3种*UbL40*的mRNA都是在较低不育起点温度的*tms5-2*突变体中表达量较高，在较高不育起点温度的*tms5-1*突变体的表达量较低，这一结果与目前对不育起点温度差异的解释相符^[9,22]。

通过比较T501、T502及T511的靶点信息可知，T501靶点序列为5'-gaacagcgcaagtcatgc-3'，Cas9蛋白切割并产生插入缺失的突变位置距离TMS5翻译起始位点ATG只有22个碱基；T502靶点序列为5'-ccaccgccccccacgggt-3'，Cas9蛋白切割位置距ATG位点57 bp；而T511靶点接近TMS5基因的最末端，距终止密码子TGA只有14个碱基。来源于明恢86和日本晴的突变体中，同一遗传背景的*tms5-2*突变体与*tms5-11*突变体间的雄性育性表现无明显差别，但它们的花粉育性及结实率都显著低于*tms5-1*突变体。与Zhou等^[15]设计的10个TMS5基因编辑靶点(TMS5a-TMS5j)相比较发现，其中TMS5f靶点距离ATG最近，位于ATG下游70 bp，该靶点位于本研究设计的T501和T502靶点下游，因此，它们可能未获得类似*tms5-1*突变体的突变类型。由于获得的*tms5-1*突变体与*tms5-2*突变体都是移码突变，而且*tms5-1*突变位置更靠近ATG，理论上T501位置的移码突变对TMS5蛋白的破坏更彻底，但为何*tms5-1*突变体表现出更高的起点温度，仅从TMS5蛋白本身无法解释该现象。近年来，Rossi^[27]、Ma^[28]、El-Brolosy^[29]、Rodriguez^[30]和马志鹏^[31]等发现斑马鱼、小鼠和拟南芥等生物体中存在

遗传补偿效应 (genetic compensation response)，当某种基因被敲除后，生命体会启动遗传补偿程序，通过提高其家族基因的工作效率等方式，以缓冲或弥补基因功能缺失带来的损失。本研究 T501 靶位点无义突变体的高不育起点温度表型是否也存在部分遗传补偿？从其下游基因 Ub_{L40} 表达分析看，在明恢 86 或日本晴背景下， $tms5-1$ 突变体的 3 种 Ub_{L40} 的表达量均比 $tms5-2$ 突变体的低，但比野生型的高，表明 $tms5-1$ 突变体的 Ub_{L40} 仍可被部分降解，这是否暗示了 T501 靶位点无义突变体存在部分遗传补偿效应，有待进一步研究。

综上，本研究不仅在粳稻和籼稻背景相应创制了一批 $tms5$ 突变体，而且在相同遗传背景（粳稻和籼稻）下创制了 $tms5-1$ 与 $tms5-2$ 材料，具有不同的不育起点温度表型，是一类崭新的研究材料，可以克服不同遗传背景的干扰，为研究水稻 $tms5$ 两系不育起点温度的分子机理及遗传调控网络提供了一种新的策略，具有重要意义。

4 结论

水稻 $tms5$ 两系不育系的不育起点温度不仅受到遗传背景影响， $tms5$ 基因突变位点不同也会影响不育起点温度，特别是 T501 位点与其余位点突变体间不育起点温度差异显著。

参考文献：

- [1] 牟同敏. 中国两系法杂交水稻研究进展和展望 [J]. *科学通报*, 2016, 61 (35): 3761–3769.
- [2] MOU T M. The research progress and prospects of two-line hybrid rice in China [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2016, 61 (35) : 3761–3769. (in Chinese)
- [3] 范优荣, 曹晓风, 张启发. 光温敏雄性不育水稻的研究进展[J]. 科学通报, 2016, 61(35): 3822–3832.
- [4] FAN Y R, CAO X F, ZHANG Q F. Progress on photoperiod thermo-sensitive genic male sterile rice[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2016, 61(35): 3822–3832. (in Chinese)
- [5] DENG Q Y, YUAN L P. Fertility Stability of P(T)GMS Lines in Rice and Its Identification Techniques [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 1998, 12 (4) : 200–206.
- [6] FAN Y R, YANG J Y, MATHIONI S M, et al. PMS1T, producing phased small-interfering RNAs, regulates photoperiod-sensitive male sterility in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113 (52) : 15144–15149.
- [7] DING J H, LU Q, OUYANG Y D, et al. A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (7) : 2654–2659.
- [8] ZHOU H, LIU Q J, LI J, et al. Photoperiod- and thermo-sensitive genic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA [J]. *Cell Research*, 2012, 22 (4) : 649–660.
- [9] ZHOU H, ZHOU M, YANG Y Z, et al. RNaseZ^{SI} processes Ub_{L40} mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4884.
- [10] YU J P, HAN J J, KIM Y J, et al. Two rice receptor-like kinases maintain male fertility under changing temperatures [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114 (46) : 12327–12332.
- [11] ZHANG H, XU C X, HE Y, et al. Mutation in CSA creates a new photoperiod-sensitive genic male sterile line applicable for hybrid rice seed production [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (1) : 76–81.
- [12] WU L Y, JING X H, ZHANG B L, et al. A natural allele of OsMS1 responds to temperature changes and confers thermosensitive genic male sterility [J]. *Nature Communications*, 2022, 13 (1) : 2055.
- [13] QIN P, DENG L C, CHEN W L, et al. A fragment substitution in promoter of $MS92/PTC1$ causes male sterility in rice [J]. *Rice Science*, 2020, 27 (5) : 396–404.
- [14] TAN Y N, SUN X W, FANG B H, et al. The Cds. 71 on TMS5 may act as a mutation hotspot to originate a TGMS trait in indica rice cultivars [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 1189.
- [15] ZHOU H, HE M, LI J, et al. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37395.
- [16] 陈日荣, 周延彪, 王黛君, 等. 利用CRISPR/Cas9技术编辑水稻温敏不育基因TMS5 [J]. *作物学报*, 2020, 46 (8) : 1157–1165.
- [17] CHEN R R, ZHOU Y B, WANG D J, et al. CRISPR/Cas9-mediated editing of the thermo-sensitive genic male-sterile gene TMS5 in rice [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46 (8) : 1157–1165. (in Chinese)
- [18] BARMAN H N, SHENG Z H, FIAZ S, et al. Generation of a new thermo-sensitive genic male sterile rice line by targeted mutagenesis of TMS5 gene through CRISPR/Cas9 system [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19 (1) : 109.
- [19] 吴明基, 林艳, 刘华清, 等. 利用CRISPR/Cas-9技术创制水稻温敏核不育系 [J]. 福建农业学报, 2018, 33 (10) : 1011–1015.

- WU M J, LIN Y, LIU H Q, et al. Development of thermo-sensitive male sterile rice with CRISPR/Cas9 technology [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33 (10) : 1011–1015. (in Chinese)
- [19] 黄忠明, 周延彪, 唐晓丹, 等. 基于CRISPR/Cas9技术的水稻温敏不育基因*tms5*突变体的构建 [J]. *作物学报*, 2018, 44 (6) : 844–851.
- HUANG Z M, ZHOU Y B, TANG X D, et al. Construction of *tms5* mutants in rice based on CRISPR/Cas9 technology [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44 (6) : 844–851. (in Chinese)
- [20] 杜茜, 费云燕, 王芳权, 等. 敲除TMS5基因获得温敏不育粳稻新材料 [J]. *中国水稻科学*, 2019, 33 (5) : 429–435.
- DU X, FEI Y Y, WANG F Q, et al. Thermo-sensitive male sterile line created by editing TMS5 gene in *Japonica* rice [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2019, 33 (5) : 429–435. (in Chinese)
- [21] FANG Y Y, YANG J L, GUO X Y, et al. CRISPR/Cas9-induced mutagenesis of TMS5 confers thermosensitive genic male sterility by influencing protein expression in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23 (15) : 8354.
- [22] 梁敏敏, 张华丽, 陈俊宇, 等. 利用CRISPR/Cas9技术创制抗稻瘟病香型早籼温敏核不育系 [J]. *中国水稻科学*, 2022, 36 (3) : 248–258.
- LIANG M M, ZHANG H L, CHEN J Y, et al. Developing fragrant early indica TGMS line with blast resistance by using CRISPR/Cas9 technology [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36 (3) : 248–258. (in Chinese)
- [23] 苏军, 胡昌泉, 翟红利, 等. 农杆菌介导籼稻明恢86高效稳定转化体系的建立 [J]. *福建农业学报*, 2003, 18 (4) : 209–213.
- SU J, HU C Q, ZHAI H L, et al. Establishment of a highly efficient and stable transforming system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in indica rice [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2003, 18 (4) : 209–213. (in Chinese)
- [24] 王慧娜, 初志战, 马兴亮, 等. 高通量PCR模板植物基因组DNA制备方法 [J]. *作物学报*, 2013, 39 (7) : 1200–1205.
- WANG H N, CHU Z Z, MA X L, et al. A high through-put protocol of plant genomic DNA preparation for PCR [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39 (7) : 1200–1205. (in Chinese)
- [25] HE Y Q, YANG J, XU C G, et al. Genetic bases of instability of male sterility and fertility reversibility in photoperiod-sensitive genic male-sterile rice [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99 (3) : 683–693.
- [26] 武小金, 尹华奇. 温敏核不育基因置于不同遗传背景下育性表现变异的遗传初探 [J]. *中国水稻科学*, 1996, 10 (1) : 1–6.
- WU X J, YIN H Q. Preliminary genetic study on the variation of fertility expression of TGMS gene in different genetic backgrounds [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 1996, 10 (1) : 1–6. (in Chinese)
- [27] ROSSI A, KONTARAKIS Z, GERRI C, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns [J]. *Nature*, 2015, 524 (7564) : 230–233.
- [28] MA Z P, ZHU P P, SHI H, et al. PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components [J]. *Nature*, 2019, 568 (7751) : 259–263.
- [29] EL-BROLOSY M A, KONTARAKIS Z, ROSSI A, et al. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation [J]. *Nature*, 2019, 568 (7751) : 193–197.
- [30] RODRIGUEZ-LEAL D, XU C, KWON C T, et al. Evolution of buffering in a genetic circuit controlling plant stem cell proliferation [J]. *Nature Genetics*, 2019, 51 (5) : 786–792.
- [31] 马志鹏, 陈军. 无义突变与“遗传补偿效应” [J]. *遗传*, 2019, 41 (5) : 359–364.
- MA Z P, CHEN J. Nonsense mutations and genetic compensation response [J]. *Hereditas*, 2019, 41 (5) : 359–364. (in Chinese)

(责任编辑：林海清)