

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2019年4月4日(04.04.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/062895 A1**

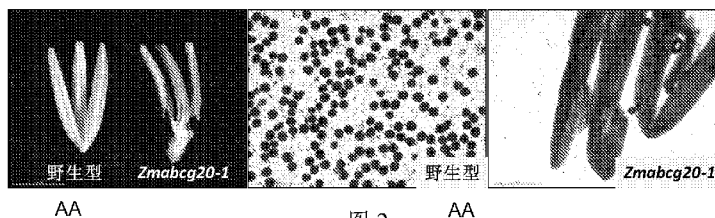
- (51) 国际专利分类号:  
*C12N 15/82* (2006.01) *A01H 5/00* (2018.01)  
*C12N 15/29* (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)  
*C07K 14/415* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/108583
- (22) 国际申请日: 2018年9月29日(29.09.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201710919714.6 2017年9月30日(30.09.2017) CN  
201710919712.7 2017年9月30日(30.09.2017) CN
- (71) 申请人: 海南波莲水稻基因科技有限公司 (HAINAN BOLIAN RICE GENE TECHNOLOGY

CO., LTD.) [CN/CN]; 中国海南省海口市紫荆路2-1号紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。

- (72) 发明人: 黄培劲(HUANG, Peijin); 中国海南省海口市紫荆路2-1号紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 李新鹏(LI, Xinpeng); 中国海南省海口市紫荆路2-1号紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 李京琳(LI, Jinglin); 中国海南省海口市紫荆路2-1号紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 陈磊(CHEN, Lei); 中国海南省海口市紫荆路2-1号紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 李燕群(LI, Yanqun); 中国海南省海口市紫荆路2-1号紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 陈江淑(CHEN, Jiangshu); 中国海南省海口市紫荆路2-1号紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 陈思兰(CHEN, Silan); 中国海南省海口市紫荆路2-1号

(54) Title: USE OF MAIZE GENE ZMABCG20 IN REGULATING CROP MALE FERTILITY AND DNA MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH MAIZE MALE FERTILITY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 玉米基因 ZmABCG20 在调控作物雄性育性中的应用以及与玉米雄性生育力相关的DNA分子标记及其应用



AA Wild type

(57) Abstract: Provided is a use of maize gene ZmABCG20 in regulating male fertility of crops. The genomic DNA sequence of ZmABCG20 in maize variety B73 is shown by SEQ ID NO: 1, and the encoded protein sequence is shown in SEQ ID NO: 3. Also provided is a mutant *zmabcg20-1* of the gene ZmABCG20 and use thereof, and the mutated gene sequence is shown in SEQ ID NO: 7. Also provided is a molecular marker identification method of the mutated gene. Also provided is a DNA molecular marker associated with male fertility in maize, the DNA molecule marker being located at bases 326-329 after the start codon of the maize gene ZmABCG20 nucleic acid sequence, and the sequence is TGCA, and the 4 base deleted maize line exhibits recessive male sterility. The DNA molecular marker of the present invention can be used to identify or breed male sterile maize germplasm resources and the like.

(57) 摘要: 玉米基因 ZmABCG20 在调控作物雄性育性中的应用, 玉米品种 B73 中 ZmABCG20 的基因组 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示, 所编码的蛋白序列如 SEQ ID NO:3 所示。基因 ZmABCG20 的突变体 *zmabcg20-1* 及其应用, 突变基因序列如 SEQ ID NO:7 所示; 还提供了该突变基因的分子标记鉴定方法。与玉米雄性生育力相关的 DNA 分子标记, 所述 DNA 分子标记位于玉米基因 ZmABCG20 核酸序列起始密码子后第 326-329 位碱基, 序列为 TGCA, 该 4 个碱基缺失的玉米品系表现出隐性雄性核不育性状。本发明的 DNA 分子标记可用于鉴定或选育雄性不育玉米种质资源等。

紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 安保光 (AN, Baoguang); 中国海南省海口市紫荆路2-1号 紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 龙湍 (LONG, Tuan); 中国海南省海口市紫荆路2-1号 紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。 吴永忠 (WU, Yongzhong); 中国海南省海口市紫荆路2-1号 紫荆信息公寓26A, Hainan 570125 (CN)。

(74) 代理人: 北京路浩知识产权代理有限公司(CN-KNOWHOW INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LIMITED); 中国北京市海淀区丹棱街3号中国电子大厦B座18层, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

# 玉米基因 *ZmABCG20* 在调控作物雄性育性中的应用以及与玉米雄性生育力相关的 DNA 分子标记及其应用

## 交叉引用

本申请要求2017年9月30日提交的专利名称为“玉米基因*ZmABCG20* 5 在调控作物雄性育性中的应用”的第201710919714.6号中国专利申请和2017年9月30日提交的专利名称为“与玉米雄性生育力相关的DNA分子标记及其应用”的第201710919712.7号中国专利申请的优先权，其全部公开内容通过引用整体并入本文。

## 技术领域

10 本发明属于基因工程和分子育种领域，具体地说，涉及玉米基因*ZmABCG20* 在调控作物雄性育性中的应用以及与玉米雄性生育力相关的DNA分子标记及其应用。

## 背景技术

植物雄性不育突变是自然界中十分普遍的现象，至少已在43个科、15 162个属的617个物种中发现了雄性不育突变体。在遗传上植物雄性不育分为细胞核雄性不育，细胞质雄性不育和细胞核细胞质互作雄性不育三大类：1)细胞核雄性不育由细胞核基因突变产生，有显性突变和隐性突变，有孢子体基因突变和配子体基因突变。显性突变和配子体基因突变只能通过雌配子遗传，隐性突变既可通过雌配子也可通过雄配子进行遗传，而且20 遵循孟德尔定律。目前已克隆了一些孢子体隐性核不育基因，如拟南芥的*ms2*，玉米的*ms45*和水稻的*mill*等(Aarts等，1997, *The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes*, *Plant Journal*, 12:615-623; Albertsen, 2006, *Male tissue-preferred regulatory sequences of MS45 gene and method of using same*, 专利号: US7154024B2; Hong等，2012, *Somatic and reproductive cell development in rice anther is regulated by a putative glutaredoxin*, *Plant Cell*, 24:577-588); 一些配子体隐性核不育基因也被25 克隆，如拟南芥的两个小孢子有丝分裂异常的突变体 *sidecar pollen* 和 *geminipollen* (Oh等，2010, *The SIDECAR POLLEN gene encodes a*

microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division, *Plant Journal*, 64:839-50; Park 等, 1998, The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation *geminipollen1* disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate, *Development*, 125:3789-99); 玉米上还克隆了一个孢子体显性核不育基因 *MS44* (Cigan and Albertsen, 1998, Reversible nuclear genetic system for male sterility in transgenic plants, US5750868); 2) 细胞质雄性不育则是由细胞质基因控制, 并没有相对应的核恢复基因, 属母性遗传; 3) 细胞核细胞质互作雄性不育由细胞质基因和细胞核基因共同控制, 其实质是细胞质与细胞核遗传物质不和的结果。不育细胞质是一些由突变线粒体基因引起, 但有相对应的核恢复基因, 能抑制不育细胞质基因。不育细胞质基因可产生一种新的蛋白质, 够影响线粒体正常功能 (Chen and Liu, 2014, Male sterility and fertility restoration in crops, *Annu Rev Plant Biol*, 65:5.1-5.28)。在育性恢复基因方面, 目前水稻中已经克隆了 *Rf-1*, *Rf-2*, *Rf-4*, *Rf-5* 等基因 (Komori 等, 2004, Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Journal*, 37:315-325; Itabashi 等, 2011, The fertility restorer gene, *Rf2*, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein, *Plant Journal*, 65:359-367; Tang 等, 2014, The rice restorer *Rf4* for wild-abortive cytoplasmic male sterility encodes a PPR protein that functions in reduction of *WA352* transcripts, *Molecular Plant*, 7:1497-500; Hu 等, 2012, The rice pentatricopeptide repeat protein *RF5* restores fertility in Hong-Lian Cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein *GRP162*, *Plant Cell*, 24:109-22)。

玉米已成为世界和我国第一大粮食作物, 是饲料、食品加工、生物能源的重要原料, 在国外也是消费量最大的蔬菜之一。目前国内种植的玉米几乎全部为杂交玉米。玉米杂交授粉主要通过人工去雄进行杂交, 需耗费大量的劳动力, 成本高昂; 而且由于去雄损伤玉米顶部叶片, 会造成制种产量损失。利用雄性不育系制种可解决人工去雄带来的问题。但玉米中曾经应用的胞质雄性不育系存在一些缺陷: 首先由于胞质雄性不育系需要特定的恢复基因恢复育性, 因此种质资源利用率很低, 限制了优良品种的选

育效率；其次部分不育系育性不稳定，在特定条件下可恢复育性，影响杂交种的纯度；最后，由于胞质基因型单一，造成玉米斑病大爆发，直接导致胞质雄性不育技术退出市场。普通核不育则可避免这些问题，如在玉米中得以应用，不但可以节省人工去雄所需的劳动力成本，而且可以提高制种产量。

植物 ABC 蛋白家族是一类膜转运蛋白，定位于细胞膜上，负责代谢物的跨膜转运；ABCG 转运蛋白是其中最大的一个亚家族。ABCG 蛋白按结构特征主要可分为两类：全尺寸蛋白含有 2 个核苷酸结合结构域和 2 个跨膜区，可独自形成完整的跨膜转运结构，完成底物的转运；半尺寸蛋白只有 1 个核苷酸结合结构域和 1 个跨膜区，需要与另一个半尺寸蛋白分子结合，才能形成完整的转运单位（Verrier 等, 2008, Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. Cell, Trends in Plant Science, 13(4): 151-159.）。拟南芥的 *AtABCG26* 基因和水稻中的直系同源基因 *OsABCG15* 编码一个花粉壁成分孢粉素前体的跨膜转运蛋白，在花药绒粘层中表达，将孢粉素前体从绒粘层细胞转运到花药室中，在花粉细胞壁上合成孢粉素。突变体 *atabcg26* 表现为花粉数量和雄性育性均极低；水稻 *osabcg15* 突变体则完全雄性不育，没有花粉；此外，水稻 *OsABCG26* 突变后也表现出雄性完全不育，表型与 *osabcg15* 相似（Zhao 等, 2016, ATP binding cassette G transporters and plant male reproduction. Plant Signal and Behavior, 11(3): e1136764. doi: 10.1080/15592324.2015.1136764）。通过基因组生物信息学分析，Pang 等（Pang 等, 2013, Inventory and general analysis of the ATP-binding cassette (ABC) gene superfamily in maize (*Zea May L.*). Gene, 2013, 526(2): 411-428）从玉米种鉴定出 54 个 ABCG 基因，但目前仍然没有发现与雄性育性相关的基因。

## 发明内容

本发明的目的是提供玉米基因 *ZmABCG20* 在调控作物雄性育性中的应用。

本发明的另一目的是提供玉米基因 *ZmABCG20* 的突变体 *zmabcg20-1* 及其应用。

为了实现本发明目的，第一方面，本发明提供玉米基因 *ZmABCG20* 在调控作物雄性育性中的应用，其中基因 *ZmABCG20* 的 cDNA 序列为：

i) SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列;

ii) SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列;

iii) 在严格条件下与 SEQ ID NO:2 所示序列杂交且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列, 所述严格条件为在含 0.1% SDS 的  $0.1 \times$  SSPE 或含 0.1% SDS 的  $0.1 \times$  SSC 溶液中, 在  $65^{\circ}\text{C}$  下杂交, 并用该溶液洗膜; 或

iv) 与 i)、ii) 或 iii) 的核苷酸序列具有 85% 以上同源性且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列。

前述的应用, 所述调控是指使作物具有雄性育性。所述应用包括:

1) 使作物包含 *ZmABCG20* 基因; 或

2) 使作物表达 *ZmABCG20* 基因编码的蛋白。

本发明首先对玉米品种京科糯 2000 种子 ( $M_0$  代) 进行钴 60 辐射诱变处理, 种植处理的种子获  $M_1$  代植株;  $M_1$  代植株自交产生种子 (为  $M_2$  代), 种植  $M_2$  代植株, 对  $M_2$  代植株进行形态学, 组织学和遗传学鉴定, 筛选不育植株; 然后对不育植株进行基因测序和 DNA 序列分析, 在分子水平上进行验证。最后获得纯合不育单株, 并用于杂交育种和生物技术研究。

本发明提供的玉米 *ZmABCG20* 基因 (花粉发育控制基因), 其突变后表现为完全雄性不育。其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4 所示; 其编码区的 DNA 序列如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:5 所示; 其编码的蛋白序列如 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:6 所示。

第二方面, 本发明提供玉米基因 *ZmABCG20* 在制备转基因植物中的应用。例如, 将携带有基因 *ZmABCG20* cDNA 或基因组序列的重组表达载体转入野生型玉米愈伤组织中, 转化后的材料经过共培养-筛选-分化-生根-转基因苗的锻炼和移栽, 筛选得到转基因植株, 然后将转基因玉米与雄性不育玉米杂交, 来恢复雄性不育玉米的育性。

第三方面, 本发明提供玉米基因 *ZmABCG20* 在恢复雄性不育植物的育性中的应用, 其中所述雄性不育性状是由该基因突变体所导致的。

第四方面, 本发明提供通过抑制玉米 *ZmABCG20* 基因活性来制备雄性核不育的转基因玉米的方法, 利用基因沉默、基因抑制、基因敲除或定向基因突变等技术使玉米中的 *ZmABCG20* 基因在转录、翻译或翻译后的

蛋白活性水平方面下降，获得雄性核不育的转基因玉米。

例如，可将携带有针对基因 *ZmABCG20* cDNA 序列的 RNAi 序列，与组成型启动子或花器官特异表达启动子可操作地连接，转入植物愈伤组织中，转化后的材料经过共培养-筛选-分化-生根-转基因苗的锻炼和移栽，  
5 筛选得到雄性核不育的转基因玉米。

在本发明的一个具体实施方式中，所述 RNAi 作用的靶 DNA 序列如 SEQ ID NO:23 所示。

第五方面，本发明提供由上述方法获得的生物材料在作物改良育种、制种中的应用。

10 第六方面，本发明提供玉米基因 *ZmABCG20* 在作物改良育种、制种中的应用。

前述的应用，使包含或表达所述 *ZmABCG20* 基因的植物，或按照上述方法或的 *ZmABCG20* 基因失活的植物，与同种具有优良农艺性状的作物进行杂交。

15 本发明中，所述作物是自花授粉或异花授粉作物，包括但不限于玉米、小麦或水稻等，优选玉米。

本发明中，所述优良农艺性状包括但不限于产量提高、品质提高、抗病虫害、抗逆、抗倒伏等。

20 第七方面，本发明提供用于抑制 *ZmABCG20* 基因活性的抑制剂，所述抑制剂选自 shRNA、siRNA、dsRNA、miRNA、cDNA、反义 RNA/DNA、低分子化合物、肽、抗体等中的至少一种。

第八方面，本发明提供含有编码上述核酸分子抑制剂的表达盒、表达载体或克隆载体。

25 第九方面，本发明提供玉米基因 *ZmABCG20* 的突变体 *zmabcg20-1* 基因，其核酸序列为：

i) 玉米基因 *ZmABCG20* 核酸序列起始密码子后第 326-329 位碱基发生 4 个碱基 TGCA 缺失所形成的突变基因；

ii) SEQ ID NO:7 所示的核苷酸序列；

30 iii) i) 或 ii) 所示序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列，且在与基因 *ZmABCG20* 的等同位置上包含 4 个碱基 TGCA 缺失；

iv) 在严格条件下与 i) 或 ii) 所示序列杂交且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列, 且在与基因 *ZmABCG20* 的等同位置上包含 4 个碱基 TGCA 缺失; 所述严格条件为在含 0.1% SDS 的 0.1 × SSPE 或含 0.1% SDS 的 0.1 × SSC 溶液中, 在 65°C 下杂交, 并用该溶液洗膜; 或

5 v) 与 i) 或 ii) 的核苷酸序列具有 85% 以上同源性且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列, 且在与基因 *ZmABCG20* 的等同位置上包含 4 个碱基 TGCA 缺失。

玉米基因 *zmabcg20-1* 的编码区 DNA 序列如 SEQ ID NO:8 所示。由玉米基因 *zmabcg20-1* 编码的蛋白, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示, 10 或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

第十方面, 本发明提供基因 *zmabcg20-1* 在调控玉米育性中的应用, 所述应用包括:

- 1) 使作物包含 *zmabcg20-1* 基因; 或
- 15 2) 使作物表达 *zmabcg20-1* 基因编码的蛋白。

前述的应用, 使包含或表达所述突变体 *zmabcg20-1* 基因的玉米表现出隐性雄性核不育。

第十一方面, 本发明提供基因 *zmabcg20-1* 在玉米改良育种、制种中的应用。

20 前述的应用, 使包含或表达所述突变体 *zmabcg20-1* 基因的玉米与具有优良农艺性状的玉米进行杂交。

第十二方面, 本发明提供表达盒、表达载体或克隆载体, 其包括包含如所述基因 *zmabcg20-1* 的核酸序列。

25 第十三方面, 本发明提供含有所述基因 *zmabcg20-1*、或所述表达盒、表达载体或克隆载体的工程菌、宿主细胞、转基因细胞系。

第十四方面, 本发明提供包含或表达所述基因 *zmabcg20-1* 的生物材料在制备转基因玉米中的应用。

第十五方面, 本发明提供雄花幼穗或雌雄同花的植物幼穗特异性启动子, 所述启动子为:

- 30 i) SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列;
- ii) SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或

多个核苷酸且具有相同功能的核苷酸序列；

iii) 在严格条件下与 SEQ ID NO:12 所示序列杂交且具有相同功能的核苷酸序列,所述严格条件为在含 0.1% SDS 的  $0.1 \times$  SSPE 或含 0.1% SDS 的  $0.1 \times$  SSC 溶液中,在  $65^{\circ}\text{C}$  下杂交,并用该溶液洗膜;或

5 iv) 与 i)、ii) 或 iii) 的核苷酸序列具有 85% 以上同源性且具有相同功能的核苷酸序列。

第十六方面,本发明提供表达盒、表达载体或克隆载体,其包括包含如 SEQ ID NO:12 所示序列的核酸。

10 第十七方面,本发明提供工程菌、转基因细胞系,其含有所述特异性启动子、或所述表达盒或载体。

第十八方面,本发明提供所述特异性启动子在调控下游基因表达中的应用。

第十九方面,本发明提供所述特异性启动子在制备转基因植物中的应用。

15 例如,将启动子序列与目的基因可操作地连接,用所得构建体转化目标植株,启动子驱动该目的基因特异地在雄花幼穗或雌雄同花的植物幼穗中表达。

第二十方面,本发明提供一种与玉米雄性生育力相关的 DNA 分子标记,所述 DNA 分子标记位于玉米基因 *ZmABCG20* 核酸序列起始密码子后第 326-329 位碱基,序列为 TGCA,该 4 个碱基缺失的玉米品系表现出隐性雄性核不育性状。

第二十一方面,本发明提供特异性扩增所述 DNA 分子标记的引物,包括:

25 上游引物 3326\_F1: 5'-CCAGACGAGGGCAGACCAG-3' (SEQ ID NO:10)

下游引物 3326\_R1: 5'-GATCTCGCCAGGGTCCACA-3'(SEQ ID NO:11)

第二十二方面,本发明提供含有所述引物 3326\_F1 和 3326\_R1 的检测试剂或试剂盒。

30 第二十三方面,本发明提供所述 DNA 分子标记、所述引物或所述检测试剂或试剂盒在玉米分子标记辅助育种中的应用。

第二十四方面，本发明提供所述 DNA 分子标记、所述引物或所述检测试剂或试剂盒在鉴别或选育雄性不育玉米种质资源中的应用。具体方法如下：

提取待测玉米的基因组 DNA，利用引物 3326\_F1 和 3326\_R1 进行 PCR 扩增反应，电泳检测扩增产物，若扩增产物出现一条大小为 79 bp 的特征条带，则待测玉米的育性正常，对应的 *ZmABCG20* 基因型为野生型；若扩增产物出现一条大小为 75 bp 的特征条带，则待测玉米为雄性不育品种，对应的 *ZmABCG20* 基因型为 *zmabcg20-1* 突变体；若扩增产物为 79 bp 和 75 bp 两条带型，则待测玉米为杂合基因型。

第二十五方面，本发明提供所述 DNA 分子标记、所述引物或所述检测试剂或试剂盒在玉米基因 *ZmABCG20* 分型中的应用。

本发明提供的 *ZmABCG20* 基因优点如下：

1) 首次发现 *ZmABCG20* 突变可造成玉米雄性不育表型，对于该基因的利用和功能研究，以及玉米雄性育性调控机制的研究具有重要意义。

2) *ZmABCG20* 突变只影响雄性育性，可造成雄性完全不育，但对雌雄育性和其它农艺性状没有影响，适用于杂交育种、制种和生产等产业化应用。

3) *ZmABCG20* 只在植物雄花幼穗中表达，时间和组织特异性强，其启动子可用于驱动任何基因在雄花幼穗中特异性表达。

本发明提供的突变体 *zmabcg20-1* 优点如下：

1) *zmabcg20-1* 是首次报道的 *ZmABCG20* 突变体，对于该基因的利用和功能研究具有重要意义。

2) 该突变体只影响雄性育性，造成雄性完全不育，但对雌雄育性和其它农艺性状没有影响。

3) 该突变体为 4 碱基缺失引起的基因删除突变，不会有育性恢复的潜在风险，也不会有遗传不稳定的风险。

4) 该突变体为基因内 4 碱基删除，不会影响 *ZmABCG20* 两侧相邻基因的功能。

5) 该突变体为 4 碱基删除突变，可设计 Indel 标记，用普通 PCR 和电泳即可完成高通量检测；同时也可设计为基因芯片检测标记。

6) 该突变体遗传背景为中国当代主栽品种，可直接用于中国玉米品

种的选育，无需漫长的改良过程。

## 附图说明

图 1 为本发明实施例 2 中突变体野生型和 *zmabcg20-1* 的雄花以及 *zmabcg20-1* 的果穗。

5 图 2 为本发明实施例 3 中野生型和突变体 *zmabcg20-1* 的花药以及花粉 I<sub>2</sub>-KI 染色结果。

图 3 为本发明实施例 7 在京科糯 2000 的不同时期幼穗及不同组织中 *ZmABCG20* 基因荧光实时定量 PCR 结果。

10 图 4 为本发明实施例 6 和 8 中鉴定的 *ZmABCG20* 基因结构和 *zmabcg20-1* 的突变位点示意图。

图 5 为本发明实施例 9 中 *zmabcg20-1* 突变体开放授粉后自交 F<sub>2</sub> 后代中的突变体和野生型植株 *ZmABCG20* 基因分子标记鉴定的电泳结果。

图 6 为本发明实施例 10 中构建 *ZmABCG20* 基因的 RNAi 载体的流程图示意图。

15 图 7 为本发明实施例 11 中对照与 RNAi 雄性不育株的花粉碘染结果。

图 8 为本发明实施例 13 中所述的 *zmabcg20-1* 不育基因杂交转育的技术路线图。

## 具体实施方式

20 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。若未特别指明，实施例均按照常规实验条件，如 Sambrook 等分子克隆实验手册 (Sambrook J & Russell DW, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2001)，或按照制造厂商说明书建议的条件。

### 实施例 1 钴 60 辐射诱变突变体库

25 2015年9月，于长沙用钴60 (<sup>60</sup>Co) 辐射京科糯2000种子 (M<sub>0</sub>代) 3公斤，辐射剂量250Gy。辐射的种子于2015年10月种植于海南三亚市崖城区田间，分单株严格自交，收获M<sub>1</sub>代种子。

30 选取M<sub>1</sub>代种子5400个株系，每个株系种植50棵单株，于2016年2月种植于海南临高田间。在苗期、抽穗期、开花期、灌浆期等经过仔细观察田间性状，筛查株型、穗型、育性、产量等各种类型突变体，对各类型突变体单株收种保存。

## 实施例 2 M<sub>2</sub>代种植与性状观察

在M<sub>2</sub>代抽穗、开花期间，在田间对花药的形态进行观察，选取颜色浅白、形态小、花粉量小等表现异常的花药在显微镜下进一步镜检。在编号为3326的家系中发现9株育性异常的植株，不能正常散粉，但结实正常（图1）。该突变体花药比野生型瘪小，颜色浅黄，无可见花粉，但在营养生长、抽穗期、穗型均与野生型没有明显区别，被选作候选突变体材料进行下一步研究。根据最终鉴定的突变基因（参见实施例6、7、8），该突变体命名为 *zmabcg20-1*。

## 实施例 3 不育突变体花粉镜检和遗传分析

通过碘染色与不着色花粉比例，统计花粉育性。在体式显微镜下观察 *zmabcg20-1* 雄花形态，花药比野生型小，颜色较浅（图2）。田间采集开花期小花，用镊子取出花药，在碘-碘化钾溶液（0.6% KI, 0.3% I<sub>2</sub>, w/w）中轻轻挤压花药，滴在载玻片上，盖上盖玻片，在显微镜下观察花粉碘染情况并拍照。野生型花粉多而染成蓝黑色，而突变体则看不到花粉粒（图2）。

突变体开放授粉下可正常结实（图1），表明该突变体为雄性不育突变体，雌穗育性不受影响。收获 *zmabcg20-1* 开放授粉种子（F<sub>1</sub>）并播种，抽穗后均可正常散粉，套袋自交可正常结实，单穗收获F<sub>2</sub>种子。取一个单穗自交的F<sub>2</sub>种子穗行播种，抽穗后鉴定育性，其中125株花粉正常碘染，38株无花粉，符合3:1分离（ $\chi^2=0.30$ ），表明该不育性状由单个隐性基因控制。

## 实施例 4 叶片采样与 DNA 提取

本项研究采用CTAB法提取玉米叶片DNA，具体方法如下：称取约0.1 g叶片，放入离心管，加入600  $\mu$ L CTAB提取缓冲液，5  $\mu$ L RNase A，震荡分散，65℃水浴0.5 hr，其间轻摇2-3次；加入等体积氯仿/Tris-饱和酚（1:1, v/v），混匀，轻摇10 min；4℃ 10000 rpm 离心 20 min；转移上清至新管，加入1/10 体积的3 M 乙酸钠（pH值5.2）、0.6-1倍体积的冷异丙醇；轻摇混匀，至絮状沉淀出现；4℃ 10000 rpm 离心 10 min；弃去上清，用体积百分含量70% 乙醇洗沉淀 2 次；风干，加入50  $\mu$ L 1 $\times$ TE 溶解沉淀，-20℃保存。用Nanodrop2000检测DNA浓度，稀释至10 ng/L用作PCR模板。

## 实施例 5 雄性不育候选基因染色体初步定位

根据IBM2 2008遗传图谱（[www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org)）筛选出在玉米各染色体

上均匀分布的SSR和Indel标记，筛选出在京科糯2000亲本间存在多态的标记，对京科糯2000和M<sub>2</sub>中的9株 $z\text{mabcg}20-1$ 进行基因型鉴定。PCR程序为PCR反应体系为：1  $\mu\text{L}$  10 $\times$ 反应缓冲液，0.25  $\mu\text{L}$  dNTP，0.25  $\mu\text{L}$  正向引物和0.25  $\mu\text{L}$ 反向引物，0.5 U Taq酶，1  $\mu\text{L}$  10 ng/ $\mu\text{L}$ 模板DNA，加超纯水将总体积补至10  $\mu\text{L}$ 。PCR反应程序为：94-98 $^{\circ}\text{C}$ 变性1-3 min，然后执行以下循环：95 $^{\circ}\text{C}$ 变性20s，53-58 $^{\circ}\text{C}$ 复性20s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30s，30-40个循环。

反应产物在6%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离。聚丙烯酰胺凝胶电泳方法如下：(1)聚丙烯酰胺胶的配制：6% PA胶80 mL，10% 过硫酸胺 250  $\mu\text{L}$  (冬天) /125  $\mu\text{L}$  (夏天)，四甲基乙二胺 (TEMED) 80  $\mu\text{L}$ 。摇匀后灌胶。用洗涤剂把玻璃板反复擦洗干净，用酒精擦净、晾干。在通风橱中将凹板涂上2%的Repel Silane后，再用酒精擦净、干燥，将另一块平板涂上0.5%的Binding Silane 1.5 mL (在1.5 ml离心管中加入7.5  $\mu\text{L}$  Binding Silane和7.5  $\mu\text{L}$ 冰醋酸，补足95%乙醇至1.5 mL)。操作过程中，防止两块玻璃板相互污染，彻底干燥后再进行玻璃板组装、灌胶。(2)预电泳：待胶凝固后，取出梳子，洗掉上边凝胶尤其注意接缝处定要洗净。先在电泳槽下槽(阴极)装入1 $\times$ TBE的电极缓冲液，将聚合的凝胶板装在电泳槽内，在上槽中注入0.5 $\times$ TBE的电极缓冲液。恒定功率40 W-65 W，预电泳约30 min。用吸管清除胶面上沉淀的尿素和气泡，插入梳子。(3)电泳：扩增产物中加入5  $\mu\text{l}$  5 $\times$  Loading Buffer混合后95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5分钟，立刻转移到冰上冷却，吸取1.5-3  $\mu\text{l}$ 加入上样孔；恒定功率40 W-65W进行电泳，至溴酚蓝到达电泳槽底部结束。视SSR扩增产物分子量大小及差异带型的可辨程度调整电泳时间。(4)银染显色，将带胶的一块玻璃板放入10%的冰乙酸固定液中，65 r/min 振荡约30 min，直至二甲苯腈全部脱色；蒸馏水冲洗2次，每次5 min；将冲洗后的胶板放入新配制的染色液(2 L水中加入2 g硝酸银、3 mL 37%甲醛)中65 r/min摇动30 min；将染色后的胶板放入蒸馏水冲洗5 s，立即拿出进行显影；将胶板快速转移到4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的显影液(2 L水中加入30 g氢氧化钠，10 ml 37%甲醛)轻轻摇动至带纹出现；将胶板置于10%的冰乙酸固定液中至无气泡产生为止；用蒸馏水冲洗2次，每次2 min；室温下自然干燥后，拍照保存图像。

在鉴定标记中，位于9号染色体的Indel标记IDP8150(正向引物：5'-TGCTCGCAGGAATAGAAAGC-3'；反向引物：

5'-GACGCAATCGACAGAGTACG-3'), 在京科糯2000中的扩增带为杂合带型, 而9株*zmabcg20-1*均为相同的纯合带型, 表明控制育性的突变基因与IDP8150连锁, 位于9号染色体。对已克隆的植物雄性育性控制基因分析, 发现玉米的*Ms45*(GRMZM2G307906), 拟南芥*AtABCG26*和水稻*OsABCG15*的直系同源基因*ZmABCG20*(GRMZM2G076526/ Zm00001d046537)均位于9号染色体。我们将这两个基因作为目标基因进行测序分析。

### 实施例 6 候选基因测序

根据玉米自交系B73的*Ms45*和*ZmABCG20*基因序列设计引物, 扩增野生型京科糯2000和*zmabcg20-1*的基因组DNA, 扩增产物测序后拼接出完整序列。用于扩增玉米*ZmABCG20*的引物对为*ZmABCG20\_1*~3, 用于扩增*Ms45*的引物对为*Ms45\_1*~*Ms45\_4*; 序列见表1:

表 1 用于扩增玉米 *ZmABCG20* 和 *Ms45* 的引物对序列

引物对名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>ZmABCG20_1</i>	CCATCTTTCTTGCTCTAGCCTT	CAGGCGAAAACCTCAAATTCCC
<i>ZmABCG20_2</i>	GACAGGGTAGACGCCATCATC	CGCATCTTGTCAGGTAGTCG
<i>ZmABCG20_3</i>	GGGCGCATAACAAGGACCG	TGCGCCCCAATTTAATTAGGTG
<i>Ms45_1</i>	GCCGAATTTGGATTGTCACG	GCACAGCTTGCACTCGTAGCT
<i>Ms45_2</i>	CTATTTTCATGCGCAACCACCTC	ACACCTGATTCAAATTCGAGCTTAAG
<i>Ms45_3</i>	CTAATGACATTATACCTCATGATTGCGA	GGTCTTGGCTTGAAGTACAGTTGC
<i>Ms45_4</i>	TCTTCTTACTGGGATCCTGACAAG	AGTCTAGAGACCATGTAAGCCTATGA
<i>ZmABCG20_T1</i>	CAACAACATTACAACAAAGTAAGCAT	CACCGTCAGCTGTGGGAAG
<i>ZmABCG20_T2</i>	AAAAGGAGGATCGGATTTGTGACTC	CCGCATCTTGTCAGGTAGTCG
<i>ZmABCG20_T3</i>	CGCATCCGACTACCTGGACAA	CTGGCACAGTTGTACGTGAGGT
<i>ZmABCG20_T4</i>	TCATGCACTACGGCTTCAACC	AGGAACGGCTAGCATAAACACTT

PCR反应体系为: 1  $\mu$ L 10 $\times$ 反应缓冲液, 0.25  $\mu$ L dNTP, 0.25  $\mu$ L 正向引物和0.25  $\mu$ L反向引物, 0.5 U Taq酶, 1  $\mu$ L 10 ng/ $\mu$ L模板DNA, 加超纯水将总体积补至10  $\mu$ L。PCR反应程序为: 94-98 $^{\circ}$ C变性1-3 min, 然后执行以下循环: 95 $^{\circ}$ C变性20s, 53-58 $^{\circ}$ C复性20s, 72 $^{\circ}$ C延伸30s, 30-40个循环。循环结束后72 $^{\circ}$ C补充延伸3-10 min, 结束反应。配置1.5% 琼脂糖凝胶, 在5 V/cm电场下电泳30min; 采用市面DNA凝胶回收试剂盒回收PCR产物。

将回收所得野生型与突变体的PCR产物DNA采用ABI3730测序仪进行测序, 测序引物分别使用正向引物与反向引物。使用常见DNA序列分析软件DNAMAN6.0对双向测序结果进行拼接。分析表明, 突变体*zmabcg20-1*的*Ms45*基因序列与野生型京科糯2000完全相同, 没有发生突变。突变体

*zmabcg20-1*的*ZmABCG20*基因全长核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示,比京科糯2000缺失了4个碱基。

*ZmABCG20*与水稻中的*OsABCG15*以及拟南芥中的*AtABCG26*为直系同源基因,而后两者突变体表型也表现为雄性不育,其中水稻突变体  
5 *osabcg15*也无成熟花粉。

### 实施例7 *ZmABCG20* 表达的组织特异性

选取从不同时期京科糯2000的花穗,时期从V7期(玉米雄穗开始成型)至V18期(玉米雄穗成熟)(How a Corn Plant Develops. Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension  
10 Service, Ames, Iowa. Reprinted 2/1996),以及幼根、茎、叶、雄花外颖、内颖和雌穗;液氮运输,-80℃保存;用TRIzol RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国)分别提取上述组织RNA,立即用PrimeScript RT reagent试剂盒(TaKaRa, 大连),按照操作说明将RNA反转录为cDNA。

荧光定量PCR采用PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix  
15 (Thermo Fisher美国),用PikoReal 96荧光定量PCR仪(Thermo Fisher, 美国)扩增和检测荧光。选择玉米Actin1基因作为内参基因,扩增引物为actinI-F和actinI-R(SEQ ID NO:15-16),用于*ZmABCG20*荧光定量的扩增引物为ABCG-2F和ABCG-2R(SEQ ID NO:17-18)。

荧光定量PCR反应体系如下: SYBR Green Mix 5 μL, Forward Primer  
20 0.5 μL, Reverse Primer 0.5 μL, cDNA 1 μL, 超纯水3 μL。PCR反应程序为: 95℃变性5 min; 95℃变性15s, 60℃退火-延伸1min, 循环40次; 60℃ 30 s。溶解曲线起始温度60℃; 最终温度95℃; 保持时间1 s; 温度增量0.2℃。

荧光实时定量PCR结果见图3, *ZmABCG20*基因仅在V10-V15时期的雄花幼穗中表达,其中在V12期表达急剧升高,其他时期仅有微量表达;在  
25 根、茎、叶、雌穗、以及雄花的内颖和外颖等其他组织均未检测到*ZmABCG20*的表达。V12期对应花粉单核期,其外壁正在形成,这一表达组织和时期与其拟南芥和水稻同源基因的功能是一致的。

### 实施例8 *ZmABCG20* 转录本序列分析

在Gramene数据库中, *ZmABCG20*基因有两个基因注释号,分别为  
30 GRMZM2G076526和Zm00001d046537,共有8个预测的转录本。为确定该基因的编码区,用覆盖*ZmABCG20*编码区全长的引物对*ZmABCG20\_T1*~

T4 (序列见表1) 扩增从京科糯2000雄花幼穗中获得的cDNA扩增, 产物按实施例6的方法分离测序。测序结果*ZmABCG20*编码区如SEQ ID NO:5所示, 与GRMZM2G076526-T001 (SEQ ID NO:2) 一致。

比对突变体基因组、京科糯2000基因组和cDNA序列, 发现*zmabcg20-1*在编码区第246位碱基, 即基因组序列中起始密码子起第326位碱基后, 位于第二个外显子的4个碱基TGCA缺失, 导致翻译的蛋白质中第82个氨基酸残基后发生移码突变, 翻译至第100个氨基酸残基后提前终止翻译。突变基因*zmabcg20-1*的编码区序列如SEQ ID NO:8所示, 编码的蛋白序列如SEQ ID NO:9所示。B73的*ZmABCG20*基因组序列、编码区序列及蛋白质序列分别见SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3; 京科糯2000的*ZmABCG20*基因组序列、编码区序列及蛋白质序列分别见SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。 *ZmABCG20*基因结构及*zmabcg20-1*突变位点见图4。

### 实施例9 功能标记鉴定 F<sub>2</sub> 群体 *ZmABCG20* 基因型

根据实施例6中得到的突变位点两侧的序列设计一对基因特异引物: 正向引物3326\_F1, 其核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示; 反向引物3326\_R1, 其核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示。

用上述引物对扩增出的产物大小如果为79 bp, 则标志着该待测植物基因型为野生型; 如果扩增产物大小为75 bp, 则标志着该待测植株为*zmabcg20-1*突变体; 如果扩增产物大小为79 bp和75 bp两条带型, 则标志着该待测植株*ZmABCG20*基因为野生型和*zmabcg20-1*突变体的杂合基因型。

在实施例3中获得的F<sub>2</sub>株系中, 随机选取野生型和突变体表型的植株, 提取叶片DNA, 与京科糯2000基因组DNA一起, 分别用上述引物对进行扩增。PCR反应体系为: 1 μL 10×反应缓冲液, 0.25 μL dNTP, 0.25 μL 正向引物和0.25 μL反向引物, 0.5 U Taq酶, 1 μL 10 ng/μL模板DNA, 加超纯水将总体积补至10 μL。PCR反应程序为: 94-98℃变性1-3 min, 然后执行以下循环: 95℃变性20s, 53-58℃复性20s, 72℃延伸30s, 30-40个循环。扩增产物用6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 40W恒功率电场下电泳1 hr, 硝酸银染色后拍照记录电泳图。

结果见图5, 野生型对照的扩增产物大小为79 bp; F<sub>2</sub>穗行中不育株的扩增产物大小均为75 bp; 所有的可育株扩增产物大小为79 bp, 或79 bp + 75 bp杂合带型, 而没有纯合75 bp带型。这一结果表明实施例6中所述突变位

点与隐性核雄性不育基因是共分离的。

### 实施例 10 *ZmABCG20* 的 RNAi 载体构建

为验证*ZmABCG20*基因功能，本实施例构建了该基因的RNAi载体。载体构建过程如图6所示，具体方法如下：

5 1、选择*ZmABCG20*中高特异性cDNA片段SEQ ID NO:23作为RNAi靶序列。从实施例7得到的V12期cDNA中，用引物对17N19-F1 (SEQ ID NO:21)和17N19-R1 (SEQ ID NO:22) 扩增出RNAi茎环结构的正向片段17N19-1；用引物对17N19-F2 (SEQ ID NO:19)和17N19-R2 (SEQ ID NO:20) 扩增出RNAi茎环结构的反向片段17N19-2。

10 2、中间载体采用pBSK-RTM (成都皓宸生物科技有限公司提供，载体pBSK-RTM由质粒pBSK改造而来。其含有序列如SEQ ID NO: 24所示的拟南芥RTM1基因的内含子，如图6所示，该内含子左侧为SacI和NotI酶切位点，右侧为XbaI和BamHI酶切位点)。采用SacI和NotI双酶切pBSK-RTM和正向片段，连接转化大肠杆菌，挑取8个转化子进行PCR验证，挑取两个阳性转化子提取质粒后送测序验证，得到pBSK-17N19-1载体。

3、以pBSK-17N19-1为模板进行17N19基因反向片段17N19-2的克隆。

采用XbaI和BamHI双酶切pBSK-17N19-1和反向片段17N19-2，连接转化大肠杆菌，挑取8个转化子进行PCR验证。挑取1个阳性转化子提取质粒后测序，证实为目的载体pBSK-17N19R。

20 用BamHI和SacI双酶切pBSK-17N19R载体，回收包含正向片段+RTM+反向片段的目标片段；同时用BamHI和SacI双酶切pCambia3301ky质粒 (成都皓宸生物科技有限公司提供，在pCambia3301质粒的多克隆位点上游插入了一个35S启动子得到pCambia3301ky)。连接目标片段和pCambia3301ky，转化大肠杆菌。挑取1个PCR阳性的转化子提取质粒，用BamHI和SacI双酶切，电泳显示 (正向片段+RTM+反向片段) 大片段和pCambia3301ky质粒骨架条带，结果表明目标片段正确连接到pCambia3301ky多克隆载体中，为载体pCambia3301-17N19R，RNAi载体构建完成。

### 实施例 11 遗传转化与转化植株表型鉴定

30 MS 和 N6 培养基成分如下：

成分	含量(mg/L)	成分	含量(mg/L)
----	----------	----	----------

	MS	N6		MS	N6
大量元素			微量元素		
KNO <sub>3</sub>	1900	2830	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.85	27.85
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.25	37.25
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	-	463	KI	0.83	0.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	400	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	1.6
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	185	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	4.4
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	166	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	1.5
有机成分			Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	-
肌醇	100	100	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	-
烟酸	0.5	0.5	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	-
维生素 B6	0.5	0.5			
维生素 B1	0.4	1			
甘氨酸	2	2			

其余步骤所用培养基如下:

YEB 培养液: 5.0 g/L酵母, 10.0 g/L蛋白胨, 5.0 g/L NaCl, 50.0 mg/L 卡那霉素和25.0 mg/L利福平, pH6.8;

5 侵染液: N6 基本培养基中加入2,4-D 1.0 mg/L, L-脯氨酸 700 mg/L, 水解酪蛋白100 mg/L, 肌醇 120 mg/L, 蔗糖68 g/L, 葡萄糖36 g/L, 乙酰丁香酮100 μmol/L, pH5.2;

共培养基: N6基本培养基, 添加脯氨酸1.38 g/L, 水解酪蛋白500 mg/L, 肌醇120 mg/L, 2,4-D 2.0 mg/L, 琼脂0.7%, 蔗糖3%, 乙酰丁香酮100 μmol/L, 半胱氨酸200 mg/L, AgNO<sub>3</sub> 0.85 mg/L, pH6.0;

10 恢复培养基: N6基本培养基中, 添加脯氨酸1.38 g/L, 水解酪蛋白500 mg/L, 肌醇120 mg/L, 2,4-D 2.0 mg/L, 琼脂0.7%, 蔗糖3%, AgNO<sub>3</sub> 0.85 mg/L, 头孢霉素400 mg/L, pH5.8;

15 第一轮筛选培养基: N6基本培养基中, 添加2,4-D 1.0 mg/L, L-脯氨酸 700 mg/L, 水解酪蛋白100 mg/L, 甘露醇20 g/L, 肌醇120 mg/L, 琼脂0.7%, 蔗糖3%, 头孢霉素400 mg/L, AgNO<sub>3</sub> 0.85 mg/L, 双丙氨膦0.3 mg/L, pH5.8;

第二轮筛选培养基: 在第一轮筛选培养基的基础上, 将双丙氨膦浓度提高至0.6 mg/L;

分化培养基: 基本培养基MS中加入1 mg/L激动素, 100 mg/L水解酪蛋白, 200 mg/L头孢霉素, 0.7%琼脂, 3%蔗糖, pH5.8;

生根培养基: 1/2 MS基本培养基中加入100 mg/L水解酪蛋白, 700 mg/L L-脯氨酸, 0.2 mg/L IBA, 0.7%琼脂, 3%蔗糖, pH5.8。

按照以下步骤进行遗传转化与再生植株获得:

5 1) 侵染材料的准备: 取玉米自交系B104自交授粉后 10-13 d 玉米果穗, 挑取幼胚, 用75%酒精浸泡15 s, 2.5%次氯酸钠浸泡消毒10min, 蒸馏水浸洗3-5 次。

2) 浸染幼胚: 从平板上挑取基因工程农杆菌的单菌落接种于YEB 培养液中, 在28℃、220 rpm振荡培养 20 h-36 h; 当细菌达到对数生长期时, 4℃、3000 rpm离心10min, 离心收集菌体, 用侵染液重悬至OD≈0.5, 即可用于侵染。将挑取好的150个幼胚用浸染液浸5 min-10 min, 用滤纸轻轻吸干浸染液。

3) 共培养和恢复培养: 将完成浸染的幼胚转入共培养基上, 22℃暗培养3 d后, 转移到恢复培养基上, 28℃暗培养7 d。

15 4) 筛选: 将按步骤3) 处理后获得的愈伤组织转到筛选培养基上28℃暗培养, 筛选两轮, 每轮3周。

5) 分化、生根: 将筛选出的抗性愈伤组织转到分化培养基上25℃暗培养7 d; 再在25℃, 16 h光照 (光照强度2000lux) -8h黑暗交替循环条件下培养, 待苗长到5 cm左右的长度时候转到生根培养基上, 28℃光照培养15 d。

20 6) 炼苗移栽: 将生根培养后的苗移栽到装有营养土的小花盆里, 28℃光照培养10 d; 将幼苗移栽到温室 (自然光照, 日温32℃, 夜温28℃) 中培养。

将经过上述步骤移栽的幼苗用引物 PCR鉴定, 确认5株为转化阳性株, 携带有实施例9设计的*ZmABCG20* RNAi片段。

25 转化植株开花时, 取对照与阳性转化植株的花药, 用实施例3中的碘染方法鉴定花粉育性。结果如图7所示, 野生型自交系B104花粉正常可育, 而一株编号R02的转化植株表现为雄性不育, 没有花粉, 与*zmabcg20-1*突变体表型一致。这一结果表明, 敲除*ZmABCG20*确实会引起雄性不育。

30 结合实施例1-10的结果, *zmabcg20-1*突变体表型、突变基因与拟南芥和水稻中*ZmABCG20*同源基因突变体一致; *ZmABCG20*基因在玉米雄花幼穗中特异表达, 而在其他时期和组织均不表达; 不育表型与*zmabcg20-1*突

变基因共分离；敲除*ZmABCG20*基因可导致与*zmabcg20-1*一致的雄性不育表型。上述结果证明：*ZmABCG20*是玉米雄性育性发育的必须基因；其功能缺失可导致玉米雄性不育表型；*zmabcg20-1*突变体的雄性不育表型是由实施例6中所述的*ZmABCG20*基因发生点突变造成的。

### 5 实施例 12 *ZmABCG20* 启动子克隆

使用引物 p*ZmABCG20*\_F（序列如 SEQ ID NO:13 所示）和 p*ZmABCG20*\_R（序列如 SEQ ID NO:14 所示）扩增玉米基因组 DNA，可以获得大小为 1653 bp 的 DNA 片段，其中起始密码子 ATG 上游 1634 bp（SEQ ID NO:12）。用在线转录元件分析工具 PlantCARE（<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>）对这段序列进行分析，发现在 +1237 和 +1385 分别为 CAAT-box 和 TATA-box；此外还有一些激素响应元件：脱落酸响应元件 ABRE（GCAACGTGTC，+1236）；茉莉酸响应元件 TGACG\_motif（TGACG，+655）和 CGTCA\_motif（CGTCA，+765）；赤霉素响应元件 GRAE\_motif（TCTGTTG，+513；AAACAGA，+1397）。在 +973 有一个昼夜节律调控元件 CAANNNNATC。丰富的转录和调控元件表明这一区域即为 *ZmABCG20* 的启动子区域。

### 实施例 13 突变基因的杂交转育

本发明获得的突变体及实施例 9 中所述突变基因的功能标记可用于各种分子标记辅助选择的方法，以回交转育为例，可按图 8 的步骤将不育基因 *zmabcg20-1* 通过杂交转育到其它玉米遗传背景中：

#### ① 杂交：

以 *zmabcg20-1* 突变株为母本，与受体玉米材料为父本杂交获得 F<sub>1</sub> 种子；

#### ② 第一轮回交：

F<sub>1</sub> 播种后获得 F<sub>1</sub> 植株，将 F<sub>1</sub> 植株与轮回亲本进行杂交，获得 BC<sub>1</sub> 种子；

#### ③ BC<sub>1</sub> 不育基因选择（前景选择）：

播种 BC<sub>1</sub> 种子，获得不少于 500 株幼苗，在幼苗期采集各单株叶片，按实施例 4 所述方法提取 DNA，利用实施例 9 中引物对（3326\_F1、3326\_R1）进行扩增和电泳，选取基因型为杂合的单株继续种植，弃去纯合野生型的单株；

#### ④ BC<sub>1</sub> 背景选择：

采用一组（例如 100 个，或 200 个等）在突变体 *zmabcg20-1* 和轮回亲本

之间存在多态的，且在基因组上均匀分布的分子标记（包括但不限于SSR、INDEL、SNP、EST、RFLP、AFLP、RAPD、SCAR等类型标记），对步骤③中选出的单株进行鉴定，选取与轮回亲本相似度高（例如大于88%相似度，或2%中选率等）的材料；

5       ⑤第二轮回交：用步骤④中选出的单株为父本，为轮回亲本授粉，获得BC<sub>2</sub>种子；

      ⑥BC<sub>2</sub>的前景与背景选择：对选出的材料重复步骤③至步骤④的操作，选出与轮回亲本相似度高于选择标准（如相似度大于98%，或2%中选率等）的BC<sub>2</sub>代植株；

10       ⑦自交获得BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>种子：对步骤⑥中选出的BC<sub>2</sub>植株进行自交，获得BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>种子；

      ⑧BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>的前景选择：将步骤⑦中获得的BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>种子播种，获得500株以上幼苗，在幼苗期采集叶片，按实施例4所述方法提取DNA，利用实施例9中引物对（3326\_F1、3326\_R1）进行扩增和电泳，选出带型为纯合突  
15  变体和杂合型的单株继续栽培，剔除纯合野生型的单株；

      ⑨BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>的背景选择及应用：将步骤⑧中选出的单株按照步骤④的方法进行背景筛选，选出100%背景纯合的单株。如果中选单株的基因型为纯合突变体，则该单株为我们的最终目标材料，可进一步与轮回亲本杂交保存材料，或其它玉米材料进行杂交。如果中选单株是杂合带型，可直接  
20  用于保存种质，或通过自交获得不育株用于杂交育种或制种。

虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之做一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

## 25 工业实用性

本发明提供玉米基因 *ZmABCG20* 在调控作物雄性育性中的应用，玉米品种 B73 中 *ZmABCG20* 的基因组 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示，所编码的蛋白序列如 SEQ ID NO:3 所示。本发明还提供基因 *ZmABCG20* 的突变体 *zmabcg20-1* 及其应用，突变基因序列如 SEQ ID NO:7 所示；还提  
30  供了该突变基因的分子标记鉴定方法。本发明提供的花粉发育控制基因、

突变体及其分子标记可应用于农作物杂交育种和杂交制种。本发明同时提供玉米基因 *ZmABCG20* 在调控作物雄性育性中的应用，玉米品种 B73 中 *ZmABCG20* 的基因组 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示，所编码的蛋白序列如 SEQ ID NO:3 所示。本发明还提供基因 *ZmABCG20* 的突变体  
5 *zmabcg20-1* 及其应用，突变基因序列如 SEQ ID NO:7 所示；还提供了该突变基因的分子标记鉴定方法。本发明提供的花粉发育控制基因、突变体及其分子标记可应用于农作物杂交育种和杂交制种，具有较好的经济价值和应用前景。

## 权 利 要 求 书

1. 玉米基因 *ZmABCG20* 在调控作物雄性育性中的应用,其特征在於,基因 *ZmABCG20* 的 cDNA 序列为:

i) SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列;

5 ii) SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列;

iii) 在严格条件下与 SEQ ID NO:2 所示序列杂交且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列,所述严格条件为在含 0.1% SDS 的  $0.1 \times$  SSPE 或含 0.1% SDS 的  $0.1 \times$  SSC 溶液中,在  $65^{\circ}\text{C}$  下杂交,并用该溶液洗膜;或

10 iv) 与 i)、ii) 或 iii) 的核苷酸序列具有 85% 以上同源性且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於,所述调控是指使作物具有雄性育性。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在於,所述应用包括:

15 1) 使作物包含 *ZmABCG20* 基因;或

2) 使作物表达 *ZmABCG20* 基因编码的蛋白。

4. 玉米基因 *ZmABCG20* 在制备转基因植物中的应用,其中基因 *ZmABCG20* 的定义同权利要求 1 中所述。

5. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在於,将携带有基因  
20 *ZmABCG20* cDNA 或基因组序列的重组表达载体转入野生型玉米愈伤组织中,转化后的材料经过共培养-筛选-分化-生根-转基因苗的锻炼和移栽,筛选得到转基因植株,然后将转基因玉米与雄性不育玉米杂交,来恢复雄性不育玉米的育性。

6. 玉米基因 *ZmABCG20* 在恢复雄性不育植物的育性中的应用,其中  
25 所述雄性不育性状是由该基因突变体所导致的。

7. 通过抑制玉米 *ZmABCG20* 基因活性来制备雄性核不育的转基因玉米的方法,其特征在於,利用基因沉默、基因抑制、基因敲除或定向基因突变技术使玉米中的 *ZmABCG20* 基因在转录、翻译或翻译后的蛋白活性水平方面下降,获得雄性核不育的转基因玉米。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在於,将携带有针对基因  
30 *ZmABCG20* cDNA 序列的 RNAi 序列,与组成型启动子或花器官特异表达

启动子可操作地连接，转入植物愈伤组织中，转化后的材料经过共培养-筛选-分化-生根-转基因苗的锻炼和移栽，筛选得到雄性核不育的转基因玉米。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述 RNAi 作用的靶 DNA 序列如 SEQ ID NO:23 所示。

10. 玉米基因 *ZmABCG20* 在作物改良育种、制种中的应用，其中基因 *ZmABCG20* 的定义同权利要求 1 中所述。

11. 由权利要求 7-9 任一项所述方法获得的生物材料在作物改良育种、制种中的应用。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的应用，其特征在于，使包含或表达所述 *ZmABCG20* 基因的植物，或由权利要求 7 或 8 所述方法获得的 *ZmABCG20* 基因失活的植物，与同种具有优良农艺性状的作物进行杂交。

13. 根据权利要求 12 所述的应用，其特征在于，所述作物是自花授粉或异花授粉作物，包括玉米、小麦或水稻，优选玉米；所述优良农艺性状包括产量提高、品质提高、抗病虫害、抗逆、抗倒伏。

14. 玉米基因 *ZmABCG20* 的突变体 *zmabcg20-1* 基因，其特征在于，其核酸序列为：

i) 玉米基因 *ZmABCG2* 核酸序列起始密码子后第 326-329 位碱基发生 4 个碱基 TGCA 缺失所形成的突变基因；

ii) SEQ ID NO:7 所示的核苷酸序列；

iii) i) 或 ii) 所示序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列，且在与基因 *ZmABCG20* 的等同位置上包含 4 个碱基 TGCA 缺失；

iv) 在严格条件下与 i) 或 ii) 所示序列杂交且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列，且在与基因 *ZmABCG20* 的等同位置上包含 4 个碱基 TGCA 缺失；所述严格条件为在含 0.1% SDS 的 0.1 × SSPE 或含 0.1% SDS 的 0.1 × SSC 溶液中，在 65℃ 下杂交，并用该溶液洗膜；或

v) 与 i) 或 ii) 的核苷酸序列具有 85% 以上同源性且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列，且在与基因 *ZmABCG20* 的等同位置上包含 4 个碱基 TGCA 缺失。

15. 由权利要求 14 所述突变体 *zmabcg20-1* 基因编码的蛋白，其特征

在于，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

16. 权利要求 14 所述突变体 *zmabcg20-1* 基因在调控玉米育性中的应用，其特征在于，所述应用包括：

- 5       1) 使作物包含 *zmabcg20-1* 基因；或  
      2) 使作物表达 *zmabcg20-1* 基因编码的蛋白。

17. 根据权利要求 16 所述的应用，其特征在于，使包含或表达所述突变体 *zmabcg20-1* 基因的玉米表现出隐性雄性核不育。

10       18. 包含或表达权利要求 14 所述突变体 *zmabcg20-1* 基因的生物材料在制备转基因玉米中的应用。

19. 权利要求 14 所述突变体 *zmabcg20-1* 基因在玉米改良育种、制种中的应用。

20. 根据权利要求 19 所述的应用，其特征在于，使包含或表达所述突变体 *zmabcg20-1* 基因的玉米与具有优良农艺性状的玉米进行杂交。

15       21. 根据权利要求 20 所述的应用，其特征在于，所述优良农艺性状包括产量提高、品质提高、抗病虫害、抗逆、抗倒伏。

22. 雄花幼穗或雌雄同花的植物幼穗特异性启动子，其特征在于，所述启动子为：

- i) SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列；  
20       ii) SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且具有相同功能的核苷酸序列；

      iii) 在严格条件下与 SEQ ID NO:12 所示序列杂交且具有相同功能的核苷酸序列，所述严格条件为在含 0.1% SDS 的 0.1 × SSPE 或含 0.1% SDS 的 0.1 × SSC 溶液中，在 65℃ 下杂交，并用该溶液洗膜；或

25       iv) 与 i)、ii) 或 iii) 的核苷酸序列具有 85% 以上同源性且具有相同功能的核苷酸序列。

23. 权利要求 22 所述特异性启动子在调控下游基因表达中的应用，其特征在于，将启动子序列与目的基因可操作地连接，用所得构建体转化目标植株，启动子驱动该目的基因特异地在雄花幼穗或雌雄同花的植物幼穗中表达。  
30

24. 与玉米雄性生育力相关的 DNA 分子标记，其特征在于，所述

DNA 分子标记位于玉米基因 ZmABCG20 核酸序列起始密码子后第 326-329 位碱基，序列为 TGCA，该 4 个碱基缺失的玉米品系表现出隐性雄性核不育性状；

其中，基因 ZmABCG20 的 cDNA 序列为：

5 i) SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列；

ii) SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列；

10 iii) 在严格条件下与 SEQ ID NO:2 所示序列杂交且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列，所述严格条件为在含 0.1% SDS 的  $0.1 \times$  SSPE 或含 0.1% SDS 的  $0.1 \times$  SSC 溶液中，在  $65^{\circ}\text{C}$  下杂交，并用该溶液洗膜；或

iv) 与 i)、ii) 或 iii) 的核苷酸序列具有 85% 以上同源性且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列。

25. 用于扩增权利要求 24 所述 DNA 分子标记的引物，其特征在于，包括：

15 上游引物 3326\_F1: 5'-CCAGACGAGGGCAGACCAG-3' 和

下游引物 3326\_R1: 5'-GATCTCGCCAGGGTCCACA-3'。

26. 含有权利要求 25 所述引物的检测试剂或试剂盒。

27. 权利要求 24 所述 DNA 分子标记、权利要求 25 所述引物、或权利要求 26 所述检测试剂或试剂盒在玉米分子标记辅助育种中的应用。

20 28. 权利要求 24 所述 DNA 分子标记、权利要求 25 所述引物、或权利要求 26 所述检测试剂或试剂盒在鉴定或选育雄性不育玉米种质资源中的应用。

25 29. 根据权利要求 28 所述的应用，其特征在于，提取待测玉米的基因组 DNA，利用引物 3326\_F1 和 3326\_R1 进行 PCR 扩增反应，电泳检测扩增产物，若扩增产物出现一条大小为 79 bp 的特征条带，则待测玉米的育性正常，对应的 ZmABCG20 基因型为野生型；若扩增产物出现一条大小为 75 bp 的特征条带，则待测玉米为雄性不育品种，对应的 ZmABCG20 基因型为突变体；若扩增产物为 79 bp 和 75 bp 两条带型，则待测玉米为杂合基因型。

30 30. 权利要求 24 所述 DNA 分子标记、权利要求 25 所述引物、或权利要求 26 所述检测试剂或试剂盒在玉米基因 ZmABCG20 分型中的应用。

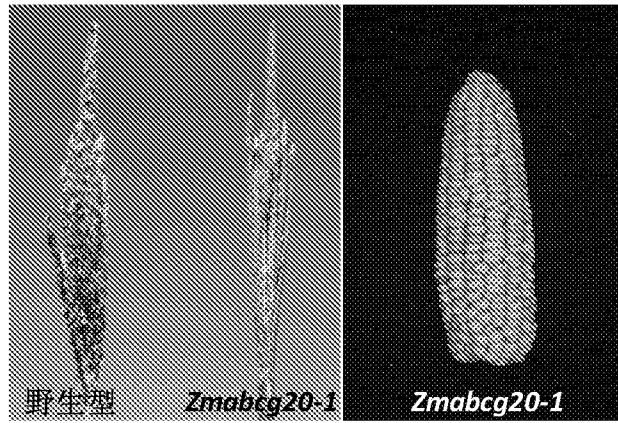


图 1

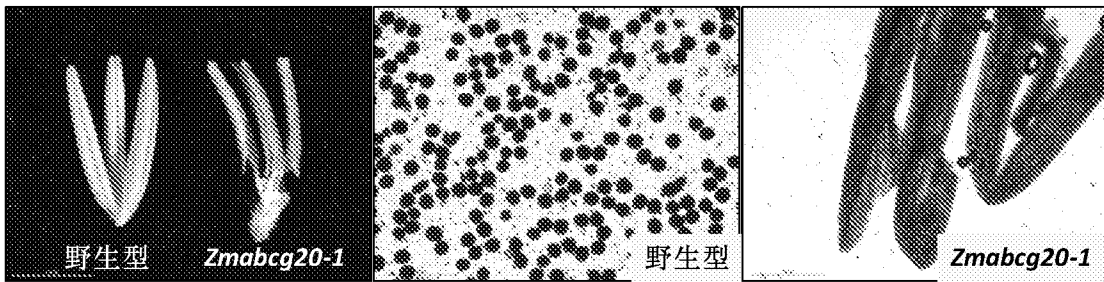


图 2

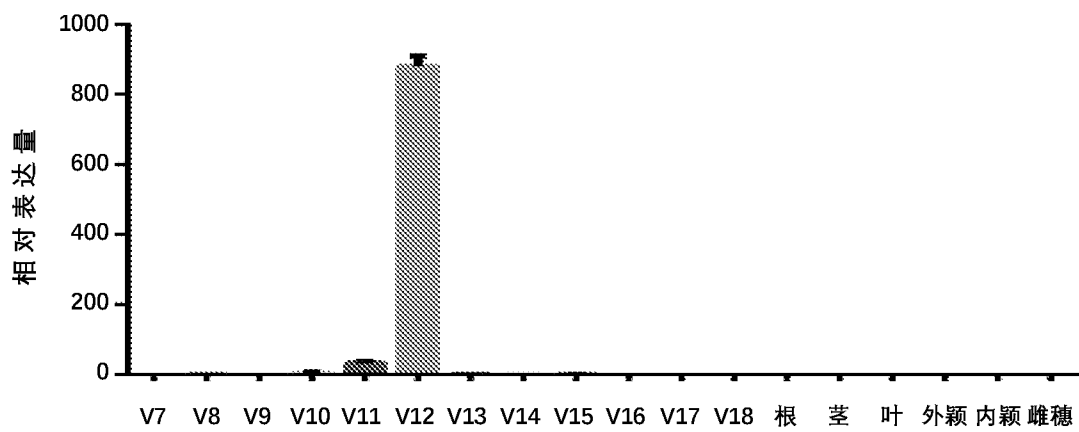


图 3

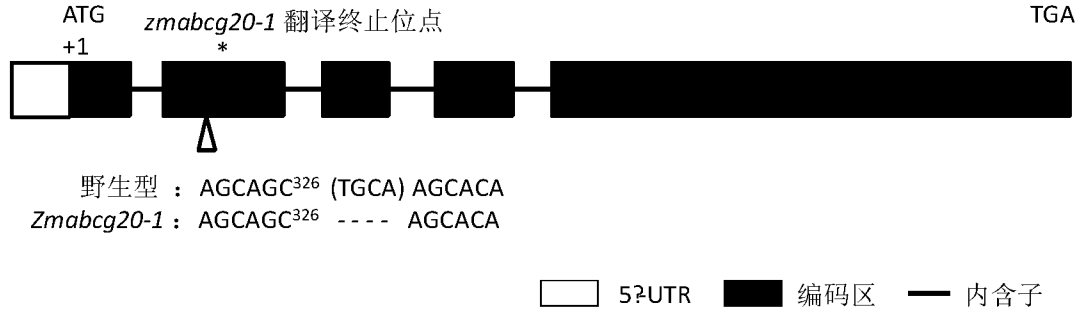


图 4

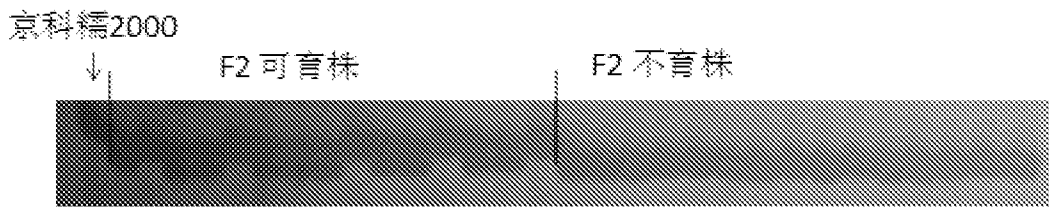


图 5

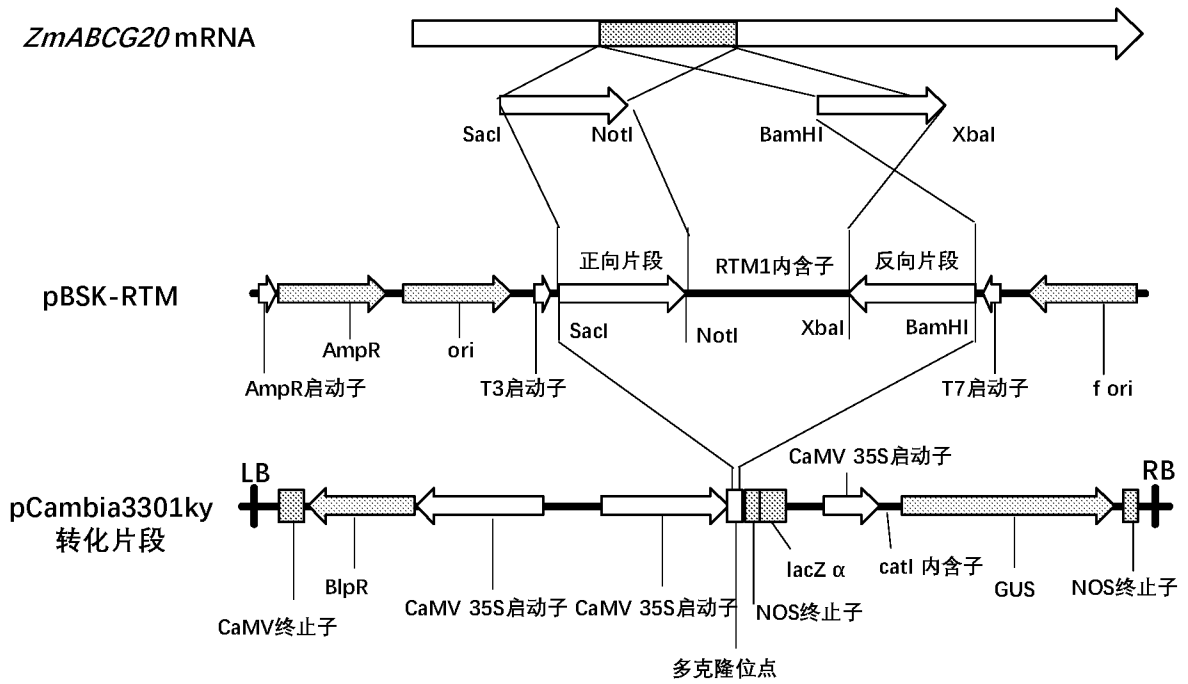


图 6

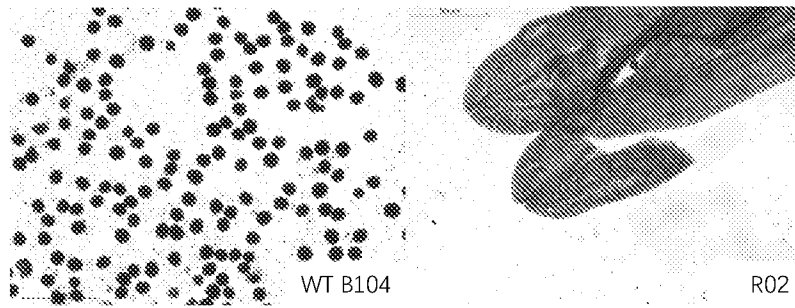


图 7

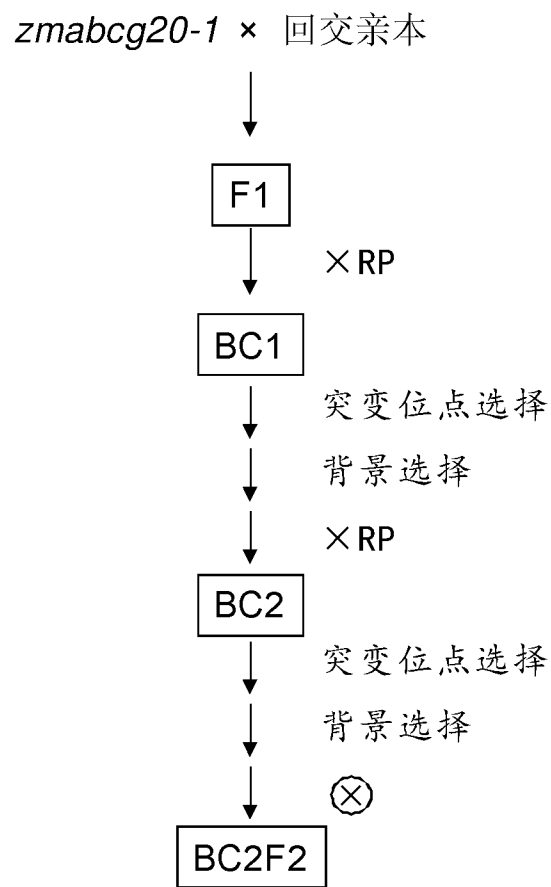


图 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/108583

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N 15/82(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; C12N 5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNABS, USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of science: abc, 转运, ZmABCG20, 雄性, 不育, 玉米, 基因, transport, transporter, male sterile, sterility, corn, zea mays, gene; GenBank+EMBL+DDBJ+中国专利生物序列检索系统: 关于SEQ ID NO: 2, 7, 12的检索, GenBank+EMBL+DDBJ+ China Patent Biological Sequence Search System: search for SEQ ID NO: 2, 7 and 12

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106609281 A (SHANGHAI NORMAL UNIVERSITY) 03 May 2017 (2017-05-03) claims 1-10, and description, paragraphs [0027], [0073] and [0079]	1-13
A	"NCBI Reference Sequence: NM_001158039.1" <i>Zea Mays ABC Transporter-Like Protein (LOC100285145), mRNA</i> , 23 April 2017 (2017-04-23), see sequence, and related information	1-30
A	"NCBI Reference Sequence: XM_008660392.2" <i>Predicted: Zea Mays ABC SEC14-Like Protein 1 (LOC100282704), Transcript Variant x1, mRNA</i> , 20 March 2017 (2017-03-20), see sequence, and related information	1-30

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 December 2018

Date of mailing of the international search report

07 January 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China  
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
 100088  
 China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/108583

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/108583**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 106609281 A	03 May 2017	None	
<hr/>			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/108583

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N 15/82(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; C12N 5/10(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N C07K A01H</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>DWPI, SIPOABS, CNABS, USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of science:abc, 转运, ZmABCG20, 雄性, 不育, 玉米, 基因, transport, transporter, male sterile, sterility, corn, zea mays, gene: GenBank+EMBL +DDBJ+中国专利生物序列检索系统:关于SEQ ID NO:2, 7, 12的检索</p>														
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 106609281 A (上海师范大学) 2017年 5月 3日 (2017 - 05 - 03) 参见权利要求1-10, 说明书第[0027][0073][0079]段</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>"NCBI Reference Sequence:NM_001158039.1" Zea mays ABC transporter-like protein(LOC100285145), mRNA, 2017年 4月 23日 (2017 - 04 - 23), 参见序列和相关信息</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>"NCBI Reference Sequence:XM_008660392.2" PREDICTED:Zea mays ABC SEC14-like protein 1(LOC100282704), transcript variant x1, mRNA, 2017年 3月 20日 (2017 - 03 - 20), 参见序列和相关信息</td> <td>1-30</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 106609281 A (上海师范大学) 2017年 5月 3日 (2017 - 05 - 03) 参见权利要求1-10, 说明书第[0027][0073][0079]段	1-13	A	"NCBI Reference Sequence:NM_001158039.1" Zea mays ABC transporter-like protein(LOC100285145), mRNA, 2017年 4月 23日 (2017 - 04 - 23), 参见序列和相关信息	1-30	A	"NCBI Reference Sequence:XM_008660392.2" PREDICTED:Zea mays ABC SEC14-like protein 1(LOC100282704), transcript variant x1, mRNA, 2017年 3月 20日 (2017 - 03 - 20), 参见序列和相关信息	1-30
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	CN 106609281 A (上海师范大学) 2017年 5月 3日 (2017 - 05 - 03) 参见权利要求1-10, 说明书第[0027][0073][0079]段	1-13												
A	"NCBI Reference Sequence:NM_001158039.1" Zea mays ABC transporter-like protein(LOC100285145), mRNA, 2017年 4月 23日 (2017 - 04 - 23), 参见序列和相关信息	1-30												
A	"NCBI Reference Sequence:XM_008660392.2" PREDICTED:Zea mays ABC SEC14-like protein 1(LOC100282704), transcript variant x1, mRNA, 2017年 3月 20日 (2017 - 03 - 20), 参见序列和相关信息	1-30												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>														
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期													
2018年 12月 24日	2019年 1月 7日													
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员													
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	王启扬													
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62088409													

## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

- a.  作为国际申请的一部分提交的:  
 附件C/ST. 25文本文件形式  
 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:  
 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))  
 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/108583

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 106609281 A	2017年 5月 3日	无	