

基于 BSA 重测序的辣椒 CMS 恢复基因连锁分子标记开发

王 萌¹, 赵 虎¹, 徐晓美², 潘尧铎³, 赵曾菁¹, 吴 星¹, 王日升^{1*}

1. 广西壮族自治区农业科学院蔬菜研究所, 广西南宁 530007; 2. 广东省农业科学院蔬菜研究所, 广东广州 510640;
3. 南宁市五象岭森林公园, 广西南宁 530219

摘 要: 三系配套是辣椒育种的主要研究方向, 鉴定并开发辣椒恢复基因连锁标记是利用分子标记辅助选育恢复系的难点。本研究以自主选育的辣椒胞质雄性不育系 014A 和恢复系 014C 为亲本构建 F₂ 分离群体, 经 χ^2 测验可育与不育的分离比例符合 3 : 1, 表明辣椒胞质雄性不育性恢复性状受 1 对显性基因控制。采用 BSA 法构建可育和不育极端 DNA 混池, 全基因组重测序并与参考基因组比对, 通过 SNP-index 法和 Fisher 检验将辣椒胞质雄性不育恢复基因定位于辣椒第 6 号染色体顶端 1.44~8.28 Mb 的区域内。根据亲本间 SNP/InDel 差异设计引物, 在亲本和极端池筛选多态性引物, 得到能稳定扩增出特异条带的分子标记 PP5 和 OP59。这 2 个标记在极端群体验证中准确率均达到 100%; 标记 OP59 是共显性标记, 位于恢复基因的候选基因 *T459-15819* 间区 17 232 bp, 该标记在不育群体准确率为 100%, 在可育群体准确率为 97.21%; 标记 PP5 位于恢复基因的候选基因 *T459-15819* 下游 318 bp, 该标记在不育群体和纯合可育群体准确率均为 100%, 不能区分杂合可育类型。该研究获得与恢复基因紧密连锁 2 个标记为加速选育辣椒 CMS 恢复系奠定基础。

关键词: 辣椒; 全基因组重测序; 胞质雄性不育; 恢复基因; 分子标记

中图分类号: S641.3 文献标识码: A

Development of Molecular Markers Linked with CMS Restoring Gene of Pepper Based on BSA Resequencing

WANG Meng¹, ZHAO Hu¹, XU Xiaomei², PAN Yaohua³, ZHAO Zengjing¹, WU Xing¹, WANG Risheng^{1*}

1. Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China; 2. Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 3. Nanning Wuxiangling Forest Park, Nanning, Guangxi 530219, China

Abstract: Three-line matching is the main research direction of pepper breeding, identification and development of restorer gene linkage markers in pepper is a difficult problem in restorer line breeding. In this study, the F₂ segregation population was constructed by using 014A and 014C as parents, the segregation ratio of fertility and sterility was 3 : 1 by χ^2 test, indicating that CMS fertility recovery trait of capsicum was controlled by one pair of dominant genes. Using the BSA method to construct the mixed pool of fertile and sterile DNA, the whole genome was re-sequenced and compared with the reference genome, by SNP-index Method and Fisher Test, the cytoplasmic male sterility restorer gene was mapped in the region of 1.44–8.28 Mb at the tip of the chromosome 6. The primers were designed according to the SNP/InDel difference between parents, and the polymorphic primers were screened in both parents and extreme pools, and the molecular markers PP5 and OP59 were obtained. The accuracy of the two markers was 100% in extreme population validation; The marker OP59 was a co-dominant marker, which was located at the candidate gene *T459-15819* interval of 17 232 bp. The accuracy of the marker was 100% in the sterile population and 97.21% in the fertile population; PP5 was located 318 bp downstream of the candidate gene *T459-15819* of the restorer gene. The accuracy of PP5

收稿日期 2022-12-16; 修回日期 2023-02-03

基金项目 广西自然科学基金项目 (No. 2019GXNSFBA245053); 粤桂联合基金项目 (No. 2020A1515410005); 广西农业科学院基本科研业务专项 (桂农科 2021JM94)。

作者简介 王 萌 (1982—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 辣椒遗传育种与生物技术。*通信作者 (Corresponding author): 王日升 (WANG Risheng), E-mail: shengriwang@126.com。

was 100% in both sterile and homozygous fertile populations. In this study, we obtained two markers closely linked with the restorer gene, which would lay the foundation for accelerating the selection of CMS restorer lines in pepper.

Keywords: pepper; wholegenome resequencing; cytoplasmic male sterility (CMS); restoration gene; molecular markers

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.002

辣椒 (*Capsicum* spp.) 是世界最大的调味料作物和世界第三大蔬菜作物, 也是我国种植面积最大、加工方式最多、消费功能最多的蔬菜和最大的调味品^[1]。目前辣椒杂交制种生产仍较多采用人工去雄, 种子生产成本高, 与国外品种相比缺乏市场竞争力^[2]。利用辣椒胞质雄性不育 (CMS) 进行三系杂交制种不仅可以确保杂交种子纯度, 更有利于保护品种的知识产权, 是辣椒育种发展的主要趋势^[3]。开发与辣椒 CMS 恢复基因紧密连锁的分子标记, 大规模对自交系及中间材料进行恢复基因筛选, 可大大提高三系育种效率。

辣椒 CMS 育性恢复的遗传控制多样且复杂, 多数研究者认为辣椒 *Rf* 基因由 1 个显性基因控制的^[4-5], WEI 等^[6]认为辣椒 CMS 恢复基因 (*Rf*) 是受 2 个主加性-显性上位基因和 1 个加性-显性多基因控制, 也有认为辣椒 CMS 育性恢复与 1 个主 QTL 和 4 个小 QTL 有关^[7]。针对辣椒 *Rf* 基因, 前人已经开发了多种类型的分子标记用于辅助育种, 这些标记包括随机扩增多态性 (RAPD) 标记^[8]、简单重复序列 (SSR) 标记^[9]、插入/缺失 (InDel) 标记^[10]、切割扩增多态性序列 (CAPS) 标记^[11]、序列特征扩增区 (SCAR) 标记^[12]和竞争性等位基因特异性 PCR (KASP) 标记^[6, 13]等。其中应用最广泛的标记 CRF-SCAR^[12, 14]在不同自然群体中对育性恢复性状的准确率最高, 同一标记在不同群体间准确率差异较大, 准确率较高的报道有 89.1%^[4]、79.2%^[15]和 100%^[16]。这些结果进一步说明, 辣椒基因组包含多个候选 *Rf* 基因, 不同恢复系可能具有基因型特异性的 *Rf* 基因^[11, 15, 17-18], 目前尚无通用标记, 特异的恢复基因需要开发相应的标记才更有效。

目前, 最广泛使用的 CRF-SCAR 标记^[15, 17]不能区分本单位的不育系 014A 和恢复系 014C, 说明恢复系 014C 可能具有不同 *Rf* 基因, 需要开发相应的连锁标记。深度测序结合 BSA 法, 在不构建遗传图谱的情况下, 可快速定位正向遗传学的性状位点^[19], 快速筛选目标基因以获得紧密连锁分子标记^[20], 目前已用于多种作物质量性状或

主效基因的定位, 如尹明智等^[21]利用该方法定位了油菜野芥胞质雄性不育恢复基因; LI 等^[22]利用 BSA 法结合基因组测序和转录组测序, 联合分析获得了大白菜中与叶状头形成相关的共同候选基因。本研究以不育系 014A 和恢复系 014C 构建了 F₂ 分离群体, 利用 BSA 法结合全基因组重测序, 获得辣椒 CMS 恢复基因相关定位区间, 根据区间内的差异 SNP/InDel 设计引物, 筛选恢复基因连锁分子标记, 为加速选育辣椒 CMS 恢复系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以不育系 014A×恢复系 014C 构建 F₂ 分离群体, 正常田间管理, 于花期调查育性, 构建测序所需基因可育混池和不育混池, 可育混池单株分别隔离, 单株留种, 每个单株种植 30 个子代, 调查育性分离情况, 判断可育混池内单株基因型为 *RfRf* 或 *Rfrf*。试验材料种植于广西农业科学院基地。

1.2 方 法

1.2.1 育性调查 2020 年对 F₂ 群体 1008 个单株进行挂牌编号, 田间正常管理, 于辣椒开花期开展 3 次以上育性调查并记录, 参考花粉指数 (PI) 法: 根据肉眼观察花粉数量分为 1~4 级, 每株调查 10 朵花, 在开花当天进行观察。1 级: 花药上布满花粉, 同可育亲本无明显差异; 2 级: 有花粉, 但不及可育亲本的一半, 花粉量明显减少; 3 级: 有很少量的花粉; 4 级: 花药干瘪皱缩, 无可见的花粉。对于不易判定等级的调查的单株, 采用多次调查的方法, 同时调查自然坐果率和果内种子数量进行辅助判断并记录。

1.2.2 建池、测序与数据处理 在 F₂ 群体采集单株叶片提取 DNA, 同时分别选择 1 级和 4 级各 30 个单株, 分别取幼嫩叶片 0.1 g 用于 DNA 的提取, DNA 分别等量混合构建不育基因池和可育基因池。2 个混池连同亲本建库后使用 Hiseq X10 PE150 上机测序, 测序深度为 30×。样本由广州基迪奥生物科技有限公司完成建库和测序。测序得到的原始数据先进行过滤, 获得 clean reads,

再利用 Burrows-Wheeler Aligner (BWA, v 0.7.16a-r1181) 将过滤后的 reads 与辣椒参考基因组 Ensembl_release47 (http://plants.ensembl.org/Capsicum_annuum/Info/Index) 进行比对。比对结果使用 GATK (v3.5) Variant Filtration 模块对 SNP 和 InDel 进行变异检测。

1.2.3 基于 SNP-index 的 BSA 分析与 Fisher 精确检验 对辣椒育性连锁定位区间进行筛选时, 首先过滤不育和可育混池中 SNP-index 均小于 0.3 或大于 0.7 的位点, 计算各混池的 SNP-index 和混池间的 $\Delta(\text{SNP-index})$, 然后以滑动窗口法对 $\Delta(\text{SNP-index})$ 在各个染色体上的分布制图。置信区间设置为 95% 和 99%, 取正向置信水平 99% 以上窗口作为候选区间^[23]。

采用 Fisher 精确检验法 (SPSS 21.0) 对 2 个混池中的等位基因深度比例进行检验, 显著性使用 P 值表示, 再次按照滑窗的方法对计算获得的 P 值结果进行拟合, 取 P 值的 $-\log_{10}$ 后绘制曼哈顿图。原始的 P 值进行 FDR 校正后获得 q 值, 筛选 q 值小于阈值 (0.05) 的位点作为显著位点, 连续的显著位点合并成一个区间, 获得显著区间。

1.2.4 DNA 提取与引物筛选 采用改良的 CTAB 法提取亲本及 F_2 群体所有单株 DNA, 检测合格后将浓度统一调整至 50 ng/ μL 用于后续试验。根据定位区间获得的基因、InDel/SNPs 信息, 结合前人报道恢复基因类型信息, 每个基因至少设计 1 对以上的引物, 优先选择位于外显子区域的 SNP 和多态性差异 5 bp 以上的 InDel 作为第一轮 SSR/InDel 分子标记, 筛选在亲本间呈现多态性的引物。在第一轮多态性引物附近, 第二轮根据基因信息和 InDel/SNPs 设计更多的标记, 再次利用双亲进行标记筛选, 然后结合 F_2 、 F_3 育性田间调查结果, 利用确定了基因型的 30 个可育混池单株 (基因型为 $RfRf$ 或 $Rfrf$)、30 个不育混池单株 (基因型为 $rfrf$) 进行筛选, 获得准确率最高的分子标记, 最后使用 F_2 群体进行准确率验证。

提取目标位点两翼各 150 bp 的碱基序列, 使用 Oligo 6 软件进行引物设计。引物序列均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。PCR 反应体系均为 10 μL , 其中 50 ng/ μL 模版 DNA 1 μL , Taq DNA 聚合酶 5 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , ddH₂O 3 μL 。PCR 扩增程序参照王日勇等^[24]的方法。扩增产物用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶 110 V 电泳分离 95 min, 用银染法进行显影;

根据标记特征, 分离群体内验证也可使用 2% 琼脂糖, 电压 120 V, 电泳 35 min; 观察结果并拍照保存。

2 结果与分析

2.1 F_2 代分离群体育性调查

通过不育系 014A 和恢复系 014C 杂交构建的 F_2 代分离群体 1008 个单株育性调查结果表明, 花粉正常可育单株为 785 株, 不育的单株为 223 株, 可育、不育分离比例均接近 3 : 1, 按 1 对基因的控制模式分别进行 χ^2 测验, χ^2 值为 1.341, P 值为 0.247, $P > 0.05$, 符合理论预测, 即可育和不育分离比符合 3 : 1 的分离规律 (表 1), 表明辣椒 CMS 育性恢复性状受 1 对显性基因控制。30 个测序用的极端可育单株通过种植调查 F_3 群体分离情况, 育性不发生分离则亲本为纯合可育 ($RfRf$), 育性发生分离则亲本为杂合可育 ($Rfrf$), 连同 30 个纯合不育单株 ($rfrf$) 用于后续分子标记筛选与验证。

表 1 F_2 代分离群体育性调查结果及 χ^2 测验
Tab. 1 Survey results of F_2 generation segregation population and χ^2 test

育性 Fertility	花粉指数 Pollen index	样本数量 Number of samples	合计 Total	χ^2	P
可育	1	785	785	1.341	0.247
不育	2	68	223		
	3	53			
	4	102			

2.2 重测序混池数据质量评估

根据亲本和混池重测序的相关数据结果显示 (表 2), 此次测序共得到 450.60 Gb 原始数据, 经数据质控过滤后获得 448.27 Gb 高质量有效数据。样品的 GC 碱基含量为 36.08%~36.84%, 测序质量控制标准 $Q_{30} > 93.75\%$ 。不育、可育测试样品与参考基因组的比对率分别为 97.84%、97.67%。基因组覆盖度 20 \times 比例约为 80% 以上。全基因组范围内分别检测到 950 253 个 InDel 和 15 142 397 个 SNP。由此可知, 本研究样本数据量足够, GC 分布正常, 测序质量合格, 测序数据与参考基因组比对结果正常, 覆盖度饱和, 可用于后续的变异分析及目标性状的基因定位。

2.3 与辣椒 CMS 育性关联的连锁区间定位

基于 SNP-index 的 BSA 分析结果显示, 正向

表 2 高通量测序数据统计结果

Tab. 2 Statistical results of high-throughput sequencing data

测序信息 Sequencing information	不育亲本 Sterile parent	可育亲本 Fertile parent	不育混池 Sterile-pool	可育混池 Fertile-pool
HQ clean data/Mb	115 815.41	128 530.10	94 269.04	109 652.66
HQ GC/Mb	42 669.36 (36.84%)	46 466.10 (36.15%)	34 017.36 (36.08%)	39 691.76 (36.20%)
HQ clean reads num/Mb	773.64 (99.61%)	857.87 (99.65%)	629.26 (99.63%)	732.49 (99.68%)
HQ Q ₃₀ /Mb	108 576.78 (93.75%)	120 591.95 (93.82%)	88 550.44 (93.93%)	103 474.11 (94.37%)
Total mapped/Mb	755.77 (97.69%)	841.60 (98.10%)	615.65 (97.84%)	715.39 (97.67%)
Unique mapped/Mb	644.75 (83.34%)	735.91 (85.78%)	539.56 (85.75%)	626.37 (85.51%)
Perfect mapped/Mb	692.63 (89.53%)	771.63 (89.95%)	562.71 (89.42%)	653.87 (89.27%)
20×/%	83.86	89.51	80.87	86.61

置信水平 99%以上窗口有 12 个区间分别位于 6 号、8 号、11 号染色体上 (表 3, 图 1)。由图 1 可知, 6 号染色体定位区间峰值高、峰形宽大, 8 号染色体存在多个小峰, 11 号染色体也存在一个峰值高的狭窄峰。由表 3 可知, 6 号染色体的第一个定位区间最大, 长度为 26.72 Mb, 约占总区间长度 32%, 其中包含 540 个基因, 约占基因总数的 64%, 基因分布相对集中。

为进一步缩小定位区间, 采用 Fisher 精确检验法对 2 个混池中的等位基因深度比例进行检验, 得到基于 $-\log_{10}(p)$ 值的全基因组分布曼哈顿图 (图 2), 获得的定位区间为 6 号染色体 1.44~8.28 Mb, 该区间内包含 4441 个 SNP、266 个 Indel 和 227 个基因。

2.4 分子标记开发

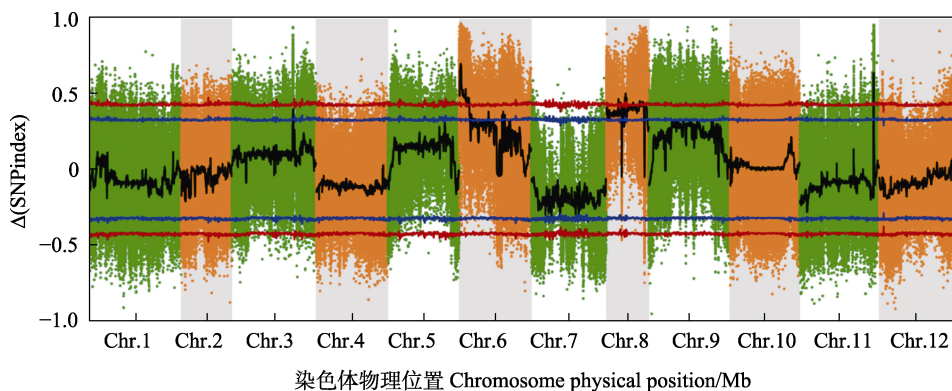
根据 6 号染色体 1.44~8.28 Mb 候选区间内 227 个基因及 SNP/InDel 位点, 共设计了 316 对引物, 扩增亲本, 筛选出 27 对在亲本间差异显著

的标记。根据基因注释获得的 3 个恢复基因候选基因, 然后重点在这 3 个基因附近设计引物并筛

表 3 依据 SNP-index 值关联区间信息统计

Tab. 3 Statistical table with association interval information based on SNP-index value

染色体 Chromosome	起始位置 Start/Mb	终止位置 End/Mb	区间长度 Length/Mb	基因数 Genes
6	0	26.72	26.72	540
6	26.88	34.88	8.00	42
8	37.46	44.36	6.90	21
8	45.06	49.82	4.76	17
8	55.58	57.94	2.36	14
8	60.84	68.78	7.94	18
8	86.86	92.58	5.72	18
8	109.22	113.36	4.14	26
8	113.40	115.56	2.16	20
8	116.62	125.20	8.58	93
8	127.90	131.36	3.46	24
11	246.94	249.14	2.20	13

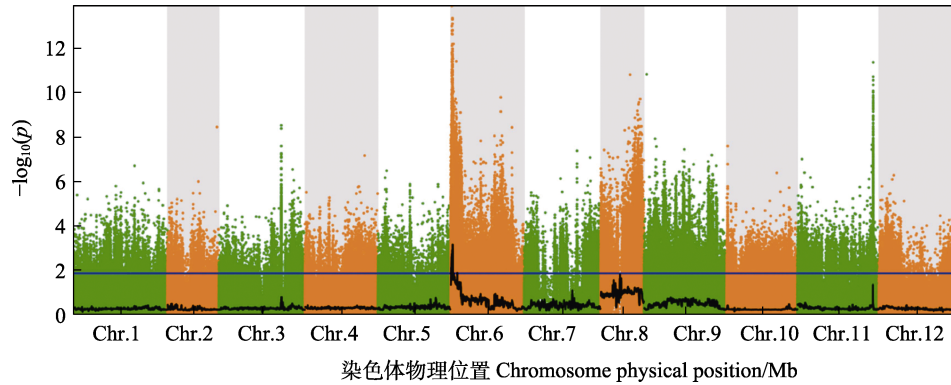


散点图为原始值, 黑色曲线为拟合值, 蓝线为 95%置信线, 红线为 99%置信线。

The scatter plot represents the original value, the black curve represents the fitted value, the blue line is the 95% confidence line, and the red line is the 99% confidence line.

图 1 $\Delta(\text{SNP-index})$ 和 SNP-index 分布曼哈顿图

Fig. 1 Manhattan plot of distribution of $\Delta(\text{SNP-index})$ and SNP-index



散点图为原始值，黑色曲线为拟合值，蓝线为 95%置信线。

Scatter plot is the original value, black curve is the fitting value, and blue line is the 95% confidence line.

图 2 基于 Fisher 检验 $-\log_{10}(p)$ 值的全基因组分布图

Fig. 2 Genome wide distribution map based on Fisher Test $-\log_{10}(p)$ value

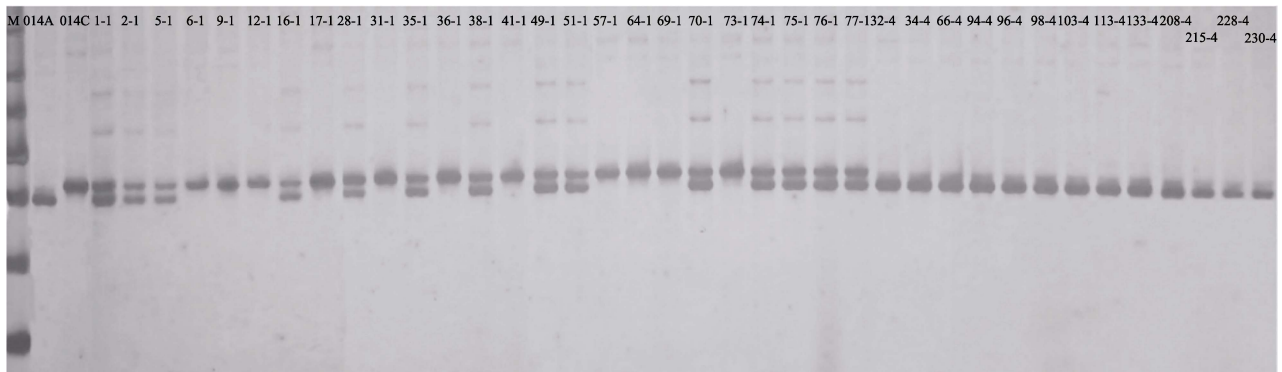
选，最终获得了能稳定扩增出特异条带的标记 OP59 和 PP5。OP59 引物序列为 F: 5'-TGGAACA-GAGTCATATTTTCTTTTCAT-3', R: 5'-CCAATT-CCGATAAAGGGTTTT-3'。PP5 引物序列为 F: 5'-TCATTCTTTAGGGGAAGCTTAGG-3', R: 5'-CGGTGTGGACAGACATTTCA-3'。根据 SNP 位点设计的标记 OP59, 在纯合可育材料可扩增出 282 bp 条带, 不育材料可扩增出 278 bp 条带, 杂合单株能扩增出 2 条带 (图 3)。根据 InDel 位点设计的标记 PP5, 在不育亲本、 F_2 杂合可育单株、不育单株中均可扩增出约 300 bp 的条带, 而纯合可育亲本和 F_2 纯合可育单株中无扩增条带, 该标记可使用琼脂糖电泳更方便快速 (图 4)。2 个标记在极端群体验证中准确率均达到 100%。

将这 2 个标记在 F_2 代分离群体随机挑选的 456 个单株进行验证, 结果表明, 2 个标记在重测序的极端群体中准确率均达到 100%。共显性标记 OP59 在不育的群体中准确率为 100%, 在可育单

株中准确率为 97.21%。标记 PP5 在不育单株和纯合可育单株中准确率均为 100%。根据与参考基因组比对结果, 标记 OP59 根据位于 6 号染色体 3 877 192 bp 处 SNP 位点设计, 参考碱基为 A, 突变碱基为 G, 该位点位于恢复基因候选 *PPR* 基因 *T459-15819* 基因间区, 距离为 17 232 bp; 标记 PP5 根据位于 6 号染色体 3 897 138 bp 处 InDel 位点设计, 参考碱基为 G, 突变碱基为 GT, 该位点位于该基因下游 318 bp。

3 讨论

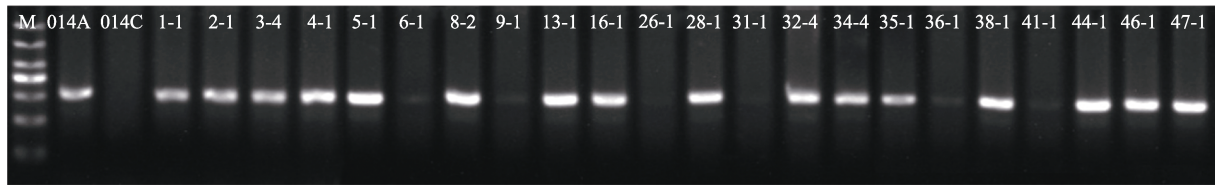
本研究表明, 辣椒 CMS 核内恢复基因经 BSA 结合法结合全基因组重测序, 比对参考基因组 Ensembl_release47, 经 Fisher 精确检验, 定位在 6 号染色体顶端 1.44~8.28 Mb 区间, 区间长度 6.84 Mb。WEI 等^[6]通过基于转录组测序的 BSR-seq 方法, 通过与参考基因组 Zunla-1 比对, 将恢复基因定位在 6 号染色体末端 16.8 Mb 的区



M: DL1000 DNA marker.

图 3 标记 OP59 在亲本及 F_2 群体内的部分扩增结果

Fig. 3 OP59 partial amplification outcomes in parents and F_2 population



M: DL1000 DNA marker.

图 4 标记 PP5 在亲本及 F₂ 群体内的部分扩增结果

Fig. 4 PP5 partial amplification outcomes in parents and F₂ population

间，其使用的试验材料包含的恢复基因被认为是受 2 个主加性-显性上位基因和一个加性-显性多基因控制。ZHANG 等^[25]也是使用 BSA 结合基因组重测序的方法在 6 号染色体的两端分别获得了一个恢复基因，该材料中辣椒 CMS 育性恢复同时受 2 对基因控制。本研究所使用的试验材料 F₂ 群体中可育：不育符合 3 : 1，因此育性恢复受 1 对基因控制，这与 WEI 等^[6]、ZHANG 等^[25]的试验材料不同，推测确实含有不同的恢复基因。

在许多农作物中多个雄性不育恢复基因 (*Rf*) 已经被鉴定，大多数恢复基因属于 *PPR* 基因 (编码蛋白含有五肽重复序列)，如水稻^[26]、油菜^[27]、棉花^[28]等。在辣椒作物上，前人报道的恢复基因有 *PPR6*^[11]、*PPR46*^[11]、*NEDD8*^[18]、长链非编码 RNA^[29]等。尹明智等^[21]通过对基因定位的候选区域进行序列分析和基因注释，发现其中的 *PPR* 基因，再进行基因克隆及功能验证，这将是分析恢复基因的一种有效手段。本研究初步获得的候选基因 *T459-15819* 也是属于 *PPR* 基因，该基因是否为调控辣椒育性恢复的关键基因，以及如何影响育性的恢复还需进一步分析验证。

本研究获得的标记 OP59 属于共显性标记，不仅能够区分基因纯合可育 (*RfRf*) 植株和不育 (*rfrf*) 植株，还能鉴定出杂合可育 (*Rfrf*) 的植株，且准确率高，聚丙烯酰胺凝胶电泳即可分辨，在实际应用中非常简便有效。标记 PP5 琼脂糖凝胶电泳检测即可，实际应用中可先用 PP5 检出纯合可育株，然后再用 OP59 检出其他类型。

本研究构建的 F₂ 群体中，根据花粉指数法将单株划分为不同的等级，花粉量减少的 2、3、4 等级全部归为不育，经 χ^2 测验，可育和不育分离比符合 3 : 1，推测辣椒 CMS 育性恢复性状受 1 对显性基因控制，这与多数研究结果一致^[4-5, 9, 14]。从本研究不育群体实际调查数据来看，单株间花粉量存在一定的差异，因此，本研究使用的恢复基因除受 1 对显性基因控制外，在 6 号、8 号、

11 号染色体上也可能存在育性修饰的微效基因，或基因表达受到环境影响，仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 邹学校, 马艳青, 戴雄泽, 李雪峰, 杨莎. 辣椒在中国的传播与产业发展[J]. 园艺学报, 2020, 47(9): 1715-1726.
- [2] 耿三省, 陈斌, 张晓芬, 杜和山. 我国辣椒品种市场需求变化趋势及育种对策[J]. 中国蔬菜, 2015(3): 1-5.
- [3] 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.
- [4] JO Y D, KIM Y M, PARK M N, YOO J H, PARK M, KIM B D, KANG B C. Development and evaluation of broadly applicable markers for *Restorer-of-fertility* in pepper[J]. Molecular Breeding, 2010, 25(2): 187-201.
- [5] MANOJ K N, SHARMA V K, SHARMA V R, AJAY K P. Genetics analysis of *Rf* gene in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. International Journal of Environment and Climate Change, 2021, 11(2): 124-130.
- [6] WEI B Q, WANG L L, BOSLAND P W, ZHANG G Y, ZHANG R. A joint segregation analysis of the inheritance of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in pepper[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2020, 145(1): 3-11.
- [7] WANG L H, ZHANG B X, LEFEBVRE V, HUANG S W, DAUBÈZE A M, PALLOIX A. QTL analysis of fertility restoration in cytoplasmic male sterile pepper[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(5): 1058-1063.
- [8] ZHANG B X, HUANG S W, YANG G M, GUO J Z. Two RAPD markers linked to a major fertility restorer gene in

- pepper[J]. *Euphytica*, 2000, 113(2): 155-161.
- [9] 叶青静, 阮美颖, 王荣青, 姚祝平, 李志邈, 万红建, 程远, 杨悦俭, 周国治. 辣椒 CMS 恢复基因的遗传分析及基因定位[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(12): 4985-4991.
YE Q J, RUAN M Y, WANG R Q, YAO Z P, LI Z M, WAN H J, CHENG Y, YANG Y J, ZHOU G Z. Genetic analysis and molecular mapping of the restorer gene for cytoplasmic male sterility in pepper[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(12): 4985-4991. (in Chinese)
- [10] 孟雅宁, 严立斌, 田玉, 范妍芹. 利用重测序 InDel 位点开发甜椒隐性核不育分子标记[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(18): 6041-6046.
MENG Y N, YAN L B, TIAN Y, FAN Y Q. Development of recessive genic male sterile molecular markers in sweet pepper using resequencing InDel sites[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(18): 6041-6046. (in Chinese)
- [11] JO Y D, HA Y, LEE J H, PARK M, BERGSMAN A C, CHOI H I, GORITSCHNIG S, KLOOSTERMAN B, DIJK P J, CHOI D, KANG B C. Fine mapping of *Restorer-of-fertility* 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.
- [12] LEE J, YOON J B, PARK H G. A CAPS marker associated with the partial restoration of cytoplasmic male sterility in chili pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Molecular Breeding*, 2008, 21(1): 95-104.
- [13] ZHANG, Z H, AN D L, CAO Y C, YU H L, ZHU Y S, MEI Y J, HANG B X, WANG L H. Development and application of KASP markers associated with *Restorer-of-fertility* gene in *Capsicum annuum* L.[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 27(12): 2757-2765.
- [14] GULYAS G, PAKOZDI K, LEE J S, HIRATA Y. Analysis of fertility restoration by using cytoplasmic male-sterile red pepper (*Capsicum annuum* L.) lines[J]. *Breeding Science*, 2006, 56(3): 331-334.
- [15] ZHANG Z H, ZHU Y S, CAO Y C, YU H L, BAI R Q, ZHAO H, ZHANG B X, WANG L H. Fine mapping of the male fertility restoration gene *CaRf032* in *Capsicum annuum* L.[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133(4): 1177-1187.
- [16] 李怡斐, 蒋晓英, 张世才, 雷开荣, 刘玉英, 杨春文, 黄任中, 黄启中, 林清. 加工型辣椒细胞质雄性不育育性基因分子标记及辅助育种[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(4): 946-952.
LI Y F, JIANG X Y, ZHANG S C, LEI K R, LIU Y Y, YANG C W, HUANG R Z, HUANG Q Z, LIN Q. A study on molecular markers linked to the cytoplasmic male sterility restoring gene and markers assisted selection in processing type pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(4): 946-952. (in Chinese)
- [17] CHENG J W, CHEN Y J, HU Y F, ZHOU Z Y, HU F, DONG J C, CHEN W L, CUI J J, WU Z M, HU K L. Fine mapping of *Restorer-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.
- [18] WEI B Q, BOSLAND P W, ZHANG Z H, WANG Y F, ZHANG G Y, WANG L L, YU J H. A predicted NEDD8 conjugating enzyme gene identified as a *Capsicum candidate Rf* gene using bulk segregant RNA sequencing[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7(1): 210-220.
- [19] 李哲理, 张林金, 谭颖, 吴朝晖, 肖丰, 苏雨婷, 谭炎宁, 肖应辉. 水稻白叶白穗突变体 *wlwp7* 的鉴定与基因定位[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(9): 2512-2517.
LI Z L, ZHANG L J, TAN Y, WU Z H, XIAO F, SU Y T, TAN Y N, XIAO Y H. Identification and gene mapping of a white leaf and white panicle mutant *wlwp7* in rice[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(9): 2512-2517. (in Chinese)
- [20] 冯诚诚, 黄如葵, 黄熊娟, 陈小凤, 黄玉辉, 梁家作, 刘杏连, 王齐旭. 基于 SLAF-seq 技术的苦瓜白粉病 SNP 分子标记开发[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(1): 108-115.
FENG C C, HUANG R K, HUANG X J, CHEN X F, HUANG Y H, LIANG J Z, LIU X L, WANG Q X. Development of SNP molecular markers for powdery mildew in bitter melon using SLAF-seq technique[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39(1): 108-115. (in Chinese)
- [21] 尹明智, 胡燕. 基于 BSA-seq 法的油菜野芥胞质雄性不育恢复基因的分析[J]. *西北植物学报*, 2020, 40(7): 1148-1156.
YIN M Z, HU Y. Location analysis of restorer genes of *sinapis arvensis* cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* based on BSA-seq method[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40(7): 1148-1156. (in Chinese)
- [22] LI R, HOU Z L, GAO L W, XIAO D, HOU X L, ZHANG C W, YAN J Y, SONG L X. Conjunctive analyses of BSA-seq and BSR-seq to reveal the molecular pathway of leafy head formation in Chinese cabbage[J]. *Plants*, 2019, 8(12): 603-620.
- [23] 张尧锋, 张冬青, 余华胜, 林宝刚, 华水金, 丁厚栋, 傅鹰. 基于极端混合池(BSA)全基因组重测序的甘蓝型油菜有限花序基因定位[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(16): 3029-3039.
ZHANG Y F, ZHANG D Q, YU H S, LIN B G, HUA S J, DING H D, FU Y. Location and mapping of the determinate growth habit of *Brassica napus* by bulked segregant analysis

- (BSA) using whole genome re-sequencing[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(16): 3029-3039. (in Chinese)
- [24] 王日勇, 谢玲玲, 周火强, 吴艺飞, 肖伟, 张竹青, 弭宝彬. 基于重测序‘墨地龙’冬瓜 In Del 标记的开发及纯度鉴定[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(20): 6760-6766.
- WANG R Y, XIE L L, ZHOU H Q, WU Y F, XIAO W, ZHANG Z Q, MI B B. Development and purity identification of InDel marker based on re-sequencing of ‘Modilong’ wax gourd[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(20): 6760-6766. (in Chinese)
- [25] ZHANG Z H, AN D L, YU H L, SUN L Q, CAO Y C, ZHANG B X, WANG L H. Fine mapping of *Rf2*, a minor *Restorer-of-fertility (Rf)* gene for cytoplasmic male sterility in chili pepper G164 (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(8): 2699-2709.
- [26] TANG H W, LUO D P, ZHOU D G, ZHANG Q Y, TIAN D S, ZHENG X M, LIU Y G. 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.
- [27] LIU Z, YANG Z H, WANG X, LI K D, AN H, LIU J, YANG G S, FU T D, YI B, HONG D F. A mitochondria-targeted PPR protein restores pol cytoplasmic male sterility by reducing *orf224* transcript levels in oilseed rape[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(7): 1082-1084.
- [28] ZHAO N, WANG Y M, HUA J P. Genomewide identification of PPR gene family and prediction analysis on restorer gene in *Gossypium*[J]. *Journal of Genetics*, 2018, 97(5): 1083-1095.
- [29] LYU J H, LIU Z B, YANG B Z, DENG M H, WANG J, LIU Y H, ZHANG Z Q, MA Y Q, CHEN W C, OU L J, ZOU X X. Systematic identification and characterization of long non-coding RNAs involved in cytoplasmic male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Plant Growth Regulation*, 2020, 91: 277-288.