

大白菜 pol CMS 育性恢复基因的表达分析

徐文玲^{1,2}, 王淑芬², 王翠花², 刘贤娴², 付卫民², 何启伟^{2,*}, 赵双宜^{3,*}

(¹山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018; ²山东省农业科学院蔬菜研究所, 山东省设施蔬菜生物学重点实验室, 国家蔬菜改良中心山东分中心, 济南 250100; ³山东大学生命科学学院, 济南 250100)

摘要: 为进一步探明 pol CMS 育性恢复基因作用的分子机理, 利用数字基因表达谱技术, 选用不育系与恢复系杂交的 F₂ 代分离群体, 对大白菜 pol CMS 育性恢复相关基因的差异表达进行了分析, 并选取部分基因进行了实时荧光定量 PCR 验证。共有 2 826 个基因差异表达, 其中 441 个上调表达, 2 385 个下调表达。GO 功能注释表明, 差异表达基因显著富集的细胞位置为细胞质、细胞器及大分子复合物等位置, 细胞器包括线粒体、叶绿体及质体等, 分子功能主要为核酸外切酶的活性, 参与的生物过程是花粉壁的形成和组装。与 pol CMS 显著相关的通路主要是核糖体、糖和氨基酸代谢、核苷酸切除和修复、RNA 降解等通路。表达谱和 RT-PCR 结果表明恢复基因主要通过下调表达调控育性恢复, 有 4 个差异表达基因与育性恢复密切相关。

关键词: 大白菜; pol CMS; 育性恢复; 差异表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 634.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 08-1475-12

Gene Expression Profiling Analysis of pol CMS Fertility-restorer Genes in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

XU Wen-ling^{1,2}, WANG Shu-fen², WANG Cui-hua², LIU Xian-xian², FU Wei-min², HE Qi-wei^{2,*}, and ZHAO Shuang-yi^{3,*}

(¹College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ²Institute of Vegetable Research of Shandong Academy of Agricultural Science, Key Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetable of Shandong Province, National Improvement Center for Vegetable, Shandong Branch, Ji'nan 250100, China; ³School of Life Science of Shandong University, Ji'nan 250100, China)

Abstract: To further reveal the molecular mechanism of pol CMS fertility-restorer genes, digital gene expression profiling technology was used to choose the F₂ segregating population hybrid of sterile lines and restorer lines. By using the F₂ lines, differential expressions of Chinese cabbage pol CMS fertility-restorer genes were analyzed and real-time fluorescence quantitative PCR was used to validate some genes. There were 2 826 differentially expressed genes, 441 of which were up-regulated, and 2 385, down-regulated. GO functional annotations showed that many differentially expressed genes were significantly clustered in cytoplasm, organelle, and macromolecular complex etc. Organelles were mainly mitochondria, chloroplasts and plastid etc. These genes showed exonuclease activities and were involved in the biological processes of pollen wall formation and assembly. Metabolic pathways significantly related to pol CMS were mainly

收稿日期: 2013-04-11; **修回日期:** 2013-06-24

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD02B01-6); 山东省现代农业产业技术体系项目 (2013-2015); 山东省农业良种工程项目 (2013lzgshucaizy)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: Hqw1215@sohu.com, syzhao@sdu.edu.cn)

the pathways of ribosomes, glucose and amino acid metabolism, peroxidase, nucleotide excision and repair, and RNA degradation. The gene expression profile and RT-PCR results indicate that restorer genes regulate fertility restoration by down-regulation. Further, four differentially expressed genes were shown to be closely related to fertility restoration were closely related to fertility restoration.

Key words: Chinese cabbage; pol CMS; fertility restorer gene; differentially expression; real-time qPCR

细胞质雄性不育 (CMS) 是母性遗传, 由于在杂种纯度、生产成本和杂种优势等方面都具有明显的优点, 现已被广泛地应用到水稻、玉米、油菜等重要作物生产实践中 (郝岗平等, 2003)。研究表明, 植物 CMS 大多是由线粒体基因组中嵌合的开放阅读框 ORFs 及其共转录基因 (例如 *atp6*, *atp9*, *cox1* 等) 的异常表达引起的, 而恢复系中含有这种嵌合基因表达的抑制或逆转基因即恢复基因 *Rf* (restorer-of-fertility), 与不育系杂交可使 F_1 花粉的育性恢复 (Liu et al., 2012)。这些育性恢复基因对线粒体不育基因表达的调控作用可发生在转录水平 (徐明良和杨金水, 1995; Leving, 1996)、RNA 的转录后加工、修饰水平 (Menasza et al., 1999; 沈金雄等, 2008) 及翻译和翻译后水平上 (Bellaou et al., 1998, 1999; Yuan et al., 2003)。对油菜各种不育类型的机理研究表明, 油菜 pol CMS、nap CMS、Ogura CMS 的育性恢复基因 *Rfp*、*Rfn*、*Rfo* 一般不阻止不育基因的转录, 而表现为转录后或翻译水平上的调控, 使得 CMS 基因的表达受到抑制, 从而恢复 CMS 的育性 (沈金雄等, 2008)。因此 CMS 的不育及育性恢复是一个复杂的核质互作过程, 从不育基因的表达达到不育的发生, 从恢复基因对不育基因的抑制到育性的恢复, 目前的研究仍不能揭示其发生的确切机理。

pol CMS 是芸薹属杂交育种中应用最广泛的不育类型, 但与其它作物如水稻相比, 对其不育及育性恢复的分子机理研究较少, 尤其是育性的恢复机理。目前虽然已经识别出线粒体的 ORF224 很可能与 pol CMS 雄性不育有关 (L'Homme et al., 1997), 但由于对线粒体进行基因转化比较困难, 目前并没有直接的证据证明在线粒体中表达 ORF224, 就可以导致 pol CMS 雄性不育。Yuan 等 (2003) 利用 10 个线粒体基因探针对 pol CMS 三系花蕾的 mtRNA 进行 Northern 检测, 认为恢复基因可能在转录后水平对 pol CMS 基因的表达进行调控。目前 Liu 等 (2012) 已将油菜 pol CMS 的 *Rfp* 基因精确定位于甘蓝型油菜第 9 连锁群的一个 29.2 kb 的 DNA 片段上, 并识别出 5 个候选基因, 其中编码 PPR 蛋白的基因最有可能就是其恢复基因。

数字基因表达谱技术是近几年发展起来的新技术, 利用该技术可以检测到很多未注释的基因和基因组部位, 为新基因的发现提供了良好线索 (Hoth et al., 2002; Moran et al., 2002; Brechenmacher et al., 2004; 杨娜, 2011)。

为了全面揭示大白菜 pol CMS 雄性不育及育性恢复过程中差异基因的表达, 构建了大白菜 pol CMS 雄性不育系与其恢复系 F_2 代的 cDNA *Tag* 文库, 进行了高通量测序, 在全基因组范围内分析这些显著差异表达基因的功能及在不育和育性恢复中的作用, 并通过实时荧光定量 PCR, 对花发育过程中多个转录因子及一些关键基因的表达进行检验, 进一步确定它们与花粉育性的相关性。这对于 pol CMS 核质互作型雄性不育的发生、育性恢复的分子机理研究将提供更多有益的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

不育系 92A, 通过 pol CMS 型油菜与亚洲蔬菜研究中心育成的‘夏阳’大白菜品种杂交, 经过

多代回交转育育成, 其相应的保持系为高代自交系 92B。

恢复系 09-399, 为从橘红心品种‘红抗 1 号’中选育而来的高代自交系。

将 92A 与 09-399 进行杂交, 它们的 F_2 代作为育性分离群体, 分别构建可育群体 (F_2 -F) 和不育群体 (F_2 -S)。

所有材料的种子在 28 °C 恒温下催芽 16 h, 4 °C 春化 20 d, 然后播种于 22 °C, 光周期 16 h/8 h 的条件下培养至现蕾、开花。按 7 级分类标准 (杨光圣和傅廷栋, 1991) 对 F_2 代的育性进行鉴定。参考前人研究结果花药发育受阻发生于孢原细胞分化期到小孢子单核期 (余凤群和傅廷栋, 1990; 胡永敏等, 2012; 张德双等, 2012), 并结合 Liu 等 (2012) 构建基因池的方法, 对孢原细胞分化期到小孢子单核期的花蕾进行取样, 分别选取其中 12 个可育与不育株的花蕾等量混合, 构建不育池 (male sterile, M-S) 和育性恢复池 (male fertile, M-F)。

1.2 数字基因表达谱测序

采用 Trizol 法 (购自 Invitrogen) 提取不育池和育性恢复池的总 RNA, 利用 Oligo(dT) 磁珠富集总 RNA 中的 mRNA, 反转录后合成双链 cDNA, 然后进行 *Nla*III 酶切, 5' 末端连接 illumina 接头 1, 再用 *Mme* I 酶切 3' 端 CATG 下游 17 bp 的碱基, 并在 3' 端连接 illumina 接头 2, 获得两端连有不同接头序列的 21 bp 标签文库。经 PCR 扩增, 用 6% TBE PAGE 胶回收 105 bp 的碱基条带, 利用 Illumina Cluster Station 和 Illumina HiSeq™ 2000 系统进行数字基因表达谱测序。测序由深圳华大基因科技股份有限公司完成。测序获得的原始序列经过去除 3' 接头序列、空载 reads、含有未知碱基 N 的 *Tag* 和拷贝数为 1 的 *Tag* 等杂质后, 获得的数据为 clean *Tag*。

基因表达注释参考大白菜基因组数据库 (<http://brassicadb.org/brad/>) 进行。

$FDR \leq 0.001$ 且倍数差异在 2 倍及以上的基因 ($\log_2 \text{ratio} \geq 1$, ratio 为差异表达倍数) 为差异表达基因。测序结果中基因表达水平用 $\log_2 \text{ratio}$ 表示。进行数据分析时以 M-S 为对照。

把所有差异表达基因向 Gene Ontology 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 的各条目 (term) 映射, 计算每个条目的基因数, 然后应用超几何检验, 找出与整个基因组背景相比在差异表达基因中显著富集的基因本体 (Gene Ontology, 简称 GO) 条目。差异检验中的 P 值表示某基因在两个样本中表达量相同的概率, P 值越小, 表明基因表达相同的概率越小, 即越有把握说明该基因在两个样本中的表达存在差异。校正后的 P 值 (corrected-p value) ≤ 0.05 定义为显著富集的 GO 条目 (Audic & Claverie, 1997)。GO 总共有 3 个本体, 分别描述基因所处的细胞位置 (cellular component)、分子功能 (molecular function)、参与的生物过程 (biological process)。

利用代谢途径公共数据库 KEGG, 应用超几何检验, 找出与整个基因组背景相比在差异表达基因中显著性富集的通路 (pathway)。Q 值 ≤ 0.05 定义为显著富集的通路 (Benjamini & Yekutieli, 2001)。

1.3 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

所选择的部分转录因子及与雄性器官发育密切相关的差异表达基因设计的引物见表 1。Trizol 法提取样品 RNA, 用 TaKaRa 的重组 DNase I 去除 DNA, Invitrogen 的 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录, 组成型表达基因 *actin* 为内参对照基因, Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。用 Ultra SYBR 预混体系进行扩增。扩增体系: Ultra SYBR 预混体系 (2×) 10 μL ; 上游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL ; 下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL ; 模板 2 μL ; 加入灭菌蒸馏水至总体积 20 μL 。以 F_2 分离群体中的不育株为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据的相对定量分析。扩增程序为: 95 °C 10 min, (95 °C 15 s, 60 °C 30 s) \times 40 个循环。用 DPS 软件分析样本间的差异显著性。

与育性密切相关的基因应满足以下条件: (1) F_2 群体中的不育株与可育株之间差异表达显著;

(2) 不育系与 F_2 群体中的不育株之间基因表达差异不显著; (3) F_1 和 F_2 群体中可育株的基因表达水平介于不育系和恢复系之间。

表 1 差异表达基因的荧光定量 PCR 分析引物列表
Table 1 List of primers for real time quantitative PCR analysis

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5' - 3')		产物长度/bp Product length
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	
<i>Bra002004</i>	AGAATGAGGCAAAGGAGCTTC	GTGAAACCCAGTGACAACCTGTC	116
<i>Bra002401</i>	AAAAGGTGCTGGAGTATTGCTT	TCCGTTCTGGCTGTAGTC	119
<i>Bra008648</i>	CTACGTGAAGGAGGAACAGG	CTTCTAGCCGTTGATCAAT	103
<i>Bra009254</i>	TTCGCCATCCCTATCTCTGT	TTAACTTGCCTATCGTATCCTTAATT	150
<i>Bra012815</i>	CAGGAGCCACTCGTTAGTTTATC	CTTCCGCCTGGATTTTGT	126
<i>Bra015480</i>	CAACTGGGACAACGGTTACC	TGCGAAAGGTGGAAGTGAG	109
<i>Bra016531</i>	GCTGAATACGGCAACATCAA	AGGGATTAGGTCCAAGAGATCC	88
<i>Bra020880</i>	TGCCTTCGATTGTGGACTC	TCAGATTCGCTTGGTTTACG	81
<i>Bra021710</i>	TCAGTGACGACCTAAAGCTCC	TACAGAAGCAGCCCAGTTTG	146
<i>Bra027246</i>	TGGTATCGGCGTAGGAGG	GAACCGTTATGGGAGGGATT	83
<i>Bra028691</i>	CAATGGCTGCTCCTCATC	GCTCGGCTTCTGGTTTGT	141
<i>Bra032610</i>	ACTGTCAACAAGACGGATAAGGTTT	AAACCGATGCTGGAGATTG	108
<i>Bra032631</i>	GTTTAGGCTGTTGGGTGTTATT	CGCTTCTACGTCCTTCATT	82
<i>Bra035604</i>	ACAGGTGGTCGTTGATTGC	CGAGAAAGGCTGTGAGTCAC	131
<i>Bra036646</i>	ATACCAGATACGGAACGAGTACG	GACGAGTCCAGCCATCGA	103
<i>Bra038691</i>	TCTTCAGCGATAAATCCTCTTGT	TCATCAAAGGCACCCTAATAGG	115
<i>Bra actin</i>	GAATCCACGAAACAACCTACAACCTC	CTCTTTGCTCATAACGGTCAGC	131

2 结果与分析

2.1 恢复系的筛选及恢复基因的遗传规律

用 pol CMS 不育材料 92A 分别与 57 份自交系进行了测配, 从 57 份材料中, 筛选到了两份有育性恢复基因的材料 09-399 (由橘红心大白菜品种‘红抗 1 号’选育而来) 和 09-505-2 (由韩国春大白菜品种‘春福’筛选而来)。09-399 与 92A 杂交的 F_1 代植株花粉完全可育, 无花蕾黄化、柱头弯曲突出等不育特征, 花药发育正常 (图 1)。其 F_2 代育性分离符合一对基因的 3:1 分离 (可育株 197 株, 不育株 52 株。 $\chi^2 = 2.25$, $\chi_{0.05}^2 = 3.84$)。



图 1 不育系、保持系、恢复系、 F_1 、 F_2 不育株 (F_2 -S) 及 F_2 可育株 (F_2 -F) 成熟花药的比较

Fig. 1 Mature anther comparison among sterile, maintainer, restorer lines, F_1 , F_2 -sterile (F_2 -S) and F_2 -fertile (F_2 -F)

2.2 测序结果和 reads 的定位分析

育性恢复池 M-F 和不育池 M-S 测序后获得的原始 reads 去除杂质数据后, 分别得到 4 610 440 和 4 454 404 个 clean Tags, 占原始数据的 96%以上(表 2)。经定位分析育性恢复池和不育池分别有 833 654 和 1 203 114 个 Tags 比对到大白菜的基因上, 3 115 698 和 2 686 465 个 Tags 分别比对到大白菜的基因组中。大白菜基因组序列数据库共有 41 173 个 unigenes, 两库比对到的基因分别是 20 970 和 22 115 个, 占大白菜参考基因总数的 50.93%和 53.71%。

表 2 测序结果总结表
Table 2 Summary of reads number

Reads 分类 Reads category	恢复池 Male fertile	不育池 Male sterile
原始 reads Raw reads	4772210	4630192
clean Tag	4610440	4454404
所有定位到基因上的 Tag All Tag mapping to gene	833654	1203114
定位到功能明确基因上的 Tag Unambiguous Tag mapping to gene	657408	938837
Tag 定位的基因数 All Tag-mapped genes	20970	22115
Tag 定位的功能明确的基因数 Unambiguous Tag-mapped genes	17581	18647
定位到基因组的 Tag Mapping to genome	3115698	2686465
未知 Tag Unknown Tag	661088	564825

2.3 差异表达基因的分布

以不育池为对照, 在育性恢复池和不育池之间共筛选到 2 826 个差异表达基因, 其中有 2 309 个基因有功能注释, 517 个基因没有任何功能注释, 上调表达基因 441 个, 下调表达基因 2 385 个。即与不育系相比, 84.39%的差异表达基因在恢复系中下调表达。

在 $\log_2(M-F/M-S) \geq 10$ (差异倍数是 2^{10}) 的 37 个高丰度差异表达的基因中有 29 个为上调表达基因, 8 个为下调表达基因。由差异表达基因的分布图(图 2)也可以看出, 虽然下调基因总的数量明显多于上调基因, 但上调基因距离 X 轴、Y 轴比值为 1:1 的对称轴远的散点明显多于下调表达基因, 即高丰度上调表达的基因多于高丰度下调表达的基因。

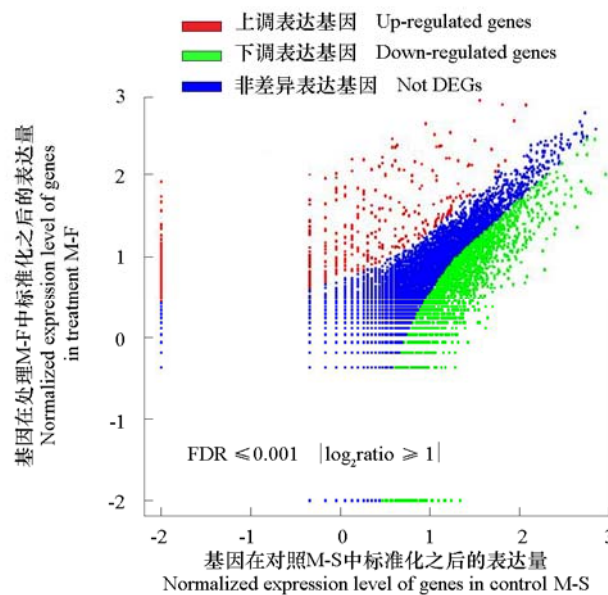


图 2 M-F/M-S 差异表达基因分布图

Fig. 2 Distribution of M-F/M-S differentially expressed genes

2.4 差异表达基因的 GO 功能和代谢通路显著性富集分析

2.4.1 差异表达基因的 GO 功能显著性富集分析

GO 功能显著性富集分析 (图 3) 表明, 差异表达基因显著富集的细胞位置为细胞质、细胞器、细胞膜及大分子复合物等位置, 其中细胞器位置包括线粒体、叶绿体、质体等细胞器, 差异表达基因主要通过下调表达调控育性的恢复。细胞质是差异表达基因富集最多的细胞位置, 共有 693 个基因差异表达, 质体是 P 值最小的细胞位置, 即两库之间筛选到的基因是差异表达的概率最大。差异表达基因参与的主要分子功能是核糖核酸外切酶的活性, 所有的差异表达基因均通过下调表达调控育性恢复。参与的生物过程主要是花粉壁的装配、花粉发育及在细胞水平上细胞组分的组装, 主要通过上调表达调控育性恢复。

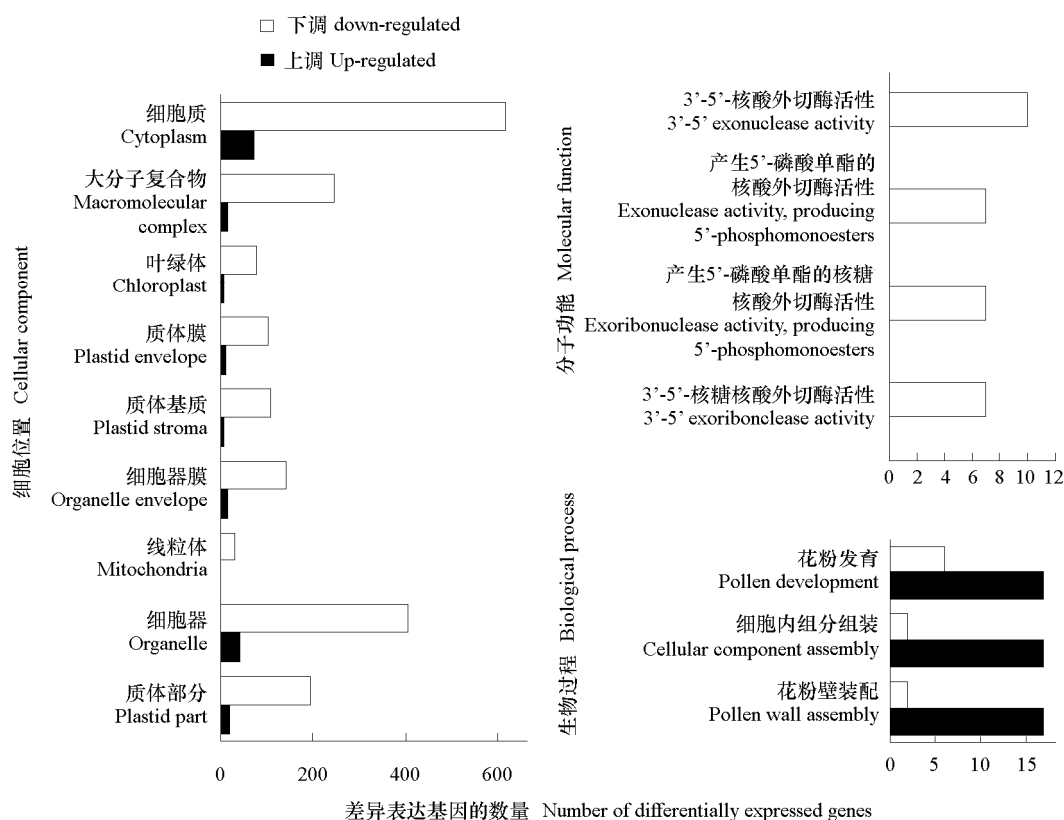


图 3 差异表达基因的功能分类

Fig. 3 Functional categorization of the significantly differentially expressed genes

2.4.2 育性恢复中差异表达基因的通路 (pathway) 显著性富集分析

通路分析有助于更进一步了解差异表达基因在育性恢复过程中的生物学功能及不同基因之间的相互协同作用。在不育和育性恢复两个 cDNA 文库之间共有 12 条通路显著富集 (表 3)。核糖体通路是差异表达基因最多的一条通路, 主要分子功能是结构分子的活性。泛素介导的蛋白质水解通路有 45 个差异基因, 主要功能是连接酶、激酶及金属离子结合的活性。与糖代谢有关的糖酵解/糖异生及果糖和甘露糖通路共有 42 个差异表达基因, 主要功能是激酶、裂解酶、氧化还原酶、异构酶及脱氢酶的活性。与核酸代谢有关的核苷酸切除修复通路及 RNA 降解通路共有 111 个差异表达基因, 主要分子功能是核酸外切酶和转录因子的活性。2 条昼夜节律通路中有 2 个为参与减数分裂过程的 *skp1*, 4 个查尔酮合成酶蛋白基因及一个参与紫外照射修复损伤的基因 *UVR3* (*UV REPAIR DEFECTIVE 3*: 紫外线损失修复 3)。

表 3 差异表达基因通路显著性富集分析列表

Table 3 List of pathway enrichment analysis

通路名 Pathway	总的差异表达基因数 Total number of differentially expressed genes	上调表达基因数 The number of up-regulated differentially expressed genes	下调表达基因数 The number of down-regulated differentially expressed genes
核糖体 Ribosome	74	3	71
RNA 降解 RNA degradation	35	7	28
泛素介导的蛋白质水解 Ubiquitin mediated proteolysis	45	8	37
昼夜节律 Circadian rhythm-plant	34	9	25
糖酵解/糖异生作用 Glycolysis/Gluconeogenesis	26	4	22
核苷酸切除修复 Nucleotide excision repair	23	3	20
果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	16	7	9
过氧化物酶体 Peroxisome	25	3	22
昼夜节律 Circadian rhythm-mammal	8	5	3
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	14	0	14
光合生物的碳固定 Carbon fixation in photosynthetic organisms	21	1	20
光合-天线蛋白 Photosynthesis-antenna proteins	7	0	7

2.5 差异表达基因中的转录因子

通过参考大白菜基因组数据库, 在所有的差异表达基因中共鉴定出 152 个转录因子, 占总差异表达基因的 5.38%, 其中仅 17 个上调表达 (表 4), 其余均下调表达 (表 5 中仅列出其中的 32 个, 均为与发育密切相关的转录因子)。但上调表达的转录因子中多数已经明确与雄性器官的发育、调控密切相关, 例如 AMS、MS1、MYB103、MYB (Bra036412)、bHLH 家族蛋白、Dof 型锌指蛋白、HAT22、SCHLAFMUTZE (SMZ) 等, 其中 AMS、MS1、MYB26、MYB103 与绒毡层的发育有关, 这些基因如果发生突变, 就可能导致雄性发育异常 (Zhao et al., 2002; Sorensen et al., 2003)。

表 4 上调转录因子列表

Table 4 List of up-regulated transcription factor

基因 Gene	差异表达水平 Differential expression level	FDR 值 FDR value	E 值 E value	基因注释 Gene annotation
<i>Bra002004</i>	11.814	1.70E-47	0	败育小孢子基因 Aborted microspore (AMS)
<i>Bra027101</i>	2.802	7.68E-07	1.79e-160	拟南芥 NAC 结构域蛋白 025 Anac025
<i>Bra035604</i>	5.924	1.30E-32	2.22e-134	MYB103 转录因子 MYB103
<i>Bra021515</i>	1.734	1.59E-20	8.57e-138	MYB26 转录因子 MYB26
<i>Bra021711</i>	4.127	2.18E-54	9.09e-151	bHLH 家族蛋白 bHLH family protein
<i>Bra015480</i>	6.071	1.92E-75	0	bHLH 家族蛋白 bHLH family protein
<i>Bra021710</i>	6.142	2.89E-77	5.96e-150	bHLH 家族蛋白 bHLH family protein
<i>Bra013041</i>	1.511	0.0001	0	bHLH 家族蛋白 bHLH family protein
<i>Bra011087</i>	1.172	0.0003	7.08e-180	未命名蛋白产物 Unnamed protein product
<i>Bra010612</i>	3.027	4.78E-10	1.76e-99	HAT22 转录因子 HAT22
<i>Bra021117</i>	2.305	4.36E-06	3.18e-98	可诱导的吲哚-3-乙酸 IAA19
<i>Bra002401</i>	10.393	1.78E-17	0	雄性不育基因 1 Male sterility 1 (MS1)
<i>Bra016531</i>	4.423	4.96E-40	4.23e-73	Myb 家族转录因子 Myb family transcription factor
<i>Bra018270</i>	4.239	1.22E-42	2.34e-141	假定转录因子 bHLH10 Putative transcription factor bHLH10
<i>Bra007123</i>	3.195	0.0009	8.77e-124	DNA 结合转录因子 DNA binding transcription factor
<i>Bra020880</i>	9.993	3.15E-13	3.52e-25	Dof 型锌指结构域蛋白 Dof-type zinc finger domain-containing protein
<i>Bra004288</i>	2.989	4.77E-07	4.55e-121	锌指结构家族蛋白 Zinc finger family protein

注: 差异表达水平用 \log_2 Ratio 表示, $\text{Ratio} = (F_2-F) / (F_2-S)$ 。下表同。

Note: The differential expression level is \log_2 Ratio, $\text{Ratio} = (F_2-F) / (F_2-S)$. The same below.

在 135 个下调表达的转录因子中, 也有许多与花发育调控有关的重要基因, 例如 *agamous-like* MADS-box、AP2 同源框亮氨酸拉链蛋白等是参与花形态建成的 ABC 成员, EMF2、DDF1、ATFYPP3 和 AFO 也是花发育特异性的转录因子基因。

表 5 部分下调转录因子列表
Table 5 List of a part of down-regulated transcription factor

基因 Gene	差异表达水平 Differential expression level	FDR 值 FDR value	E 值 E value	基因注释 Gene annotation
<i>Bra000378</i>	- 1.538	5.97E-09	6.39e-99	异常花器官 Abnormal floral organs (AFO)
<i>Bra017980</i>	- 2.640	5.91E-05	1.88e-178	拟南芥 NAC 结构域蛋白 062 ANAC062
<i>Bra028291</i>	- 8.190	9.57E-05	9.86e-69	AP2 结构域蛋白 AP2 domain-containing protein
<i>Bra025720</i>	- 1.926	5.31E-05	0	生长素响应因子 19 ARF19
<i>Bra028110</i>	- 3.488	6.89E-11	0	生长素响应因子 8 ARF8
<i>Bra000680</i>	- 3.312	0.0005	2.25e-96	MYB6 转录因子 MYB6 transcription factor
<i>Bra015646</i>	- 3.109	7.24E-05	2.40e-158	碱性亮氨酸拉链家族转录因子 bZIP family transcription factor
<i>Bra026963</i>	- 2.758	1.29E-13	5.87e-90	矮小及延迟开花基因 1 DDF1 DWARF AND DELAYED FLOWERING 1
<i>Bra016763</i>	- 2.633	7.87E-13	3.46e-63	矮小及延迟开花基因 1 DDF1 DWARF AND DELAYED FLOWERING 1
<i>Bra014191</i>	- 8.738	1.11E-05	1.13e-46	DNA 结合转录因子 DNA binding transcription factor
<i>Bra003969</i>	- 2.181	3.25E-26	4.67e-82	DNA 结合家族蛋白 DNA-binding family protein
<i>Bra032610</i>	- 9.132	2.05E-07	4.07e-67	HFR1 转录因子 LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED
<i>Bra017489</i>	- 1.125	4.16E-05	2.30e-107	同源框亮氨酸拉链蛋白 Homeobox-leucine zipper protein
<i>Bra033844</i>	- 1.517	1.54E-06	8.88e-139	DNA 结合转录因子 DNA binding transcription factor
<i>Bra012815</i>	- 10.29	1.35E-16	0	Myb 家族转录因子 Myb family transcription factor
<i>Bra004593</i>	- 8.658	2.13E-05	2.98e-95	Myb 家族转录因子 Myb family transcription factor
<i>Bra036412</i>	- 8.488	8.02E-05	6.77e-179	Myb 家族转录因子 Myb family transcription factor
<i>Bra011749</i>	- 8.739	1.11E-05	7.86e-143	MYB73 转录因子 MYB73 transcription factor
<i>Bra000308</i>	- 2.166	1.30E-06	0	RWP-RK 结构域蛋白 RWP-RK domain-containing protein
<i>Bra008309</i>	- 3.167	4.10E-05	1.06e-154	NAC 结构域蛋白 14 NAC-domain protein 14
<i>Bra006015</i>	- 2.781	4.28E-18	9.17e-155	NAC 结构域蛋白 5-7 NAC-domain protein 5-7
<i>Bra028645</i>	- 2.066	2.69E-10	1.03e-158	NAC 结构域蛋白 5-8 NAC-domain protein 5-8
<i>Bra006165</i>	- 3.778	4.59E-14	7.43e-81	假定蛋白 Predicted protein
<i>Bra040974</i>	- 2.841	6.09E-16	0	假定 C2H2 型锌指蛋白 Putative C2H2 zinc finger protein
<i>Bra024875</i>	- 2.110	5.58E-09	0	RGA-I 类蛋白 1 RGA-like protein 1
<i>Bra026999</i>	- 3.675	1.61E-20	0	scarecrow 转录因子家族蛋白 Scarecrow transcription factor family protein
<i>Bra003311</i>	- 3.453	0.0002	1.28e-175	scarecrow 转录因子家族蛋白 Scarecrow transcription factor family protein
<i>Bra014802</i>	- 2.471	1.39E-08	0	F-box 家族蛋白 F-box family protein
<i>Bra003239</i>	- 3.842	7.15E-15	2.85e-111	WRKY 转录因子 70 WRKY transcription factor 70
<i>Bra020709</i>	- 3.167	4.10E-05	1.26e-149	锌指结构家族蛋白 Zinc finger family protein
<i>Bra003194</i>	- 3.120	3.61E-15	1.22e-113	锌指结构家族蛋白 Zinc finger family protein
<i>Bra020261</i>	- 3.331	5.52E-15	3.27e-104	锌指结构类蛋白 Zinc finger protein-like

2.6 部分与育性相关的差异表达基因的实时荧光定量 PCR (real-time qPCR) 验证

为了进一步验证获得的差异表达基因与育性相关, 选取 16 个差异表达基因, 包括 10 个转录因子, 6 个与花发育相关的重要基因, 根据这些基因序列设计引物 (表 1), 分别对不育系、保持系、恢复系、F₁ 以及 F₂ 分离群体的花蕾提取 RNA, 以 F₂ 中的不育群体为对照, 进行了 real-time qPCR 验证。除 *Bra012815*、*Bra032610* 这 2 个转录因子在育性恢复群体中下调表达, 其余皆上调表达。

结果 (表 6) 表明, 在 F₂ 代分离群体中, 所有的上调表达基因表达量在 F₂ 代育性恢复株中均高于 F₂ 中的不育株, 下调表达基因在育性恢复株中低于不育株, 并且大部分基因的表达差异显著, 这与表达谱测序结果一致。与之对应的是: 上调表达基因在恢复系和 F₁ 这 2 个可育群体中的表达量与 F₂ 中育性恢复株变化趋势相同, 均高于不育系和 F₂ 中不育株这两个不育群体中的基因表达量, 表现为上调表达。2 个下调基因 (*Bra012815*、*Bra032610*) 在恢复系和 F₁ 2 个可育群体中的表达量与 F₂ 中育性恢复株变化趋势也相同, 均低于不育系和 F₂ 中不育株这两个不育群体中的基因表达量, 表现为下调表达, 且表达差异极显著。保持系的表达与其它所有材料不同, 不管是上调还是下调表达基因, 与不育群体相比, 所有基因在保持系中均表现上调表达。

按照各个样本的基因型及各被验证基因的表达水平, 设定了与育性密切相关基因的筛选方法, 在 16 个差异表达基因中, *Bra008648*(DNA 修复蛋白 RAD23: DNA repair protein RAD23)、*Bra002004* (AMS)、*Bra009254* (花粉壁蛋白 B4: Pollen coat protein B4)、*Bra027246* (ATA20) 这 4 个基因满足所有条件, 为与育性恢复最密切相关的基因。

表 6 部分差异表达基因实时荧光定量 PCR 验证
Table 6 Real-time qPCR validation of the different expression genes

基因 Genes	差异表达基因的相对表达量 Relative expression levels of differentially expressed genes					
	不育系 Male sterile lines	保持系 Maintainer lines	恢复系 Restorer lines	F ₁	F ₂ 中可育株 F ₂ -F	F ₂ 中不育株 F ₂ -S
<i>Bra002004</i>	1.68 c	5.22 a	5.43 a	3.49 b	2.02 c	1.00 cd
<i>Bra002401</i>	1.50 d	3.70 a	2.64 b	2.67 b	2.02 c	1.00 e
<i>Bra008648</i>	1.18 de	1.29 d	9.78 a	2.96 b	2.61 c	1.00 e
<i>Bra009254</i>	1.66 d	16.41 b	44.04 a	11.70 c	14.47 bc	1.00 d
<i>Bra012815</i>	1.17 b	1.44 a	0.34 e	0.51 d	0.491 d	1.00 c
<i>Bra015480</i>	1.29 c	4.58 a	2.95 b	2.67 b	1.71 c	1.00 c
<i>Bra016531</i>	0.86 d	2.87 a	1.54 c	1.58 c	1.44 b	1.00 e
<i>Bra020880</i>	1.61 d	4.48 a	3.61 b	2.89 c	2.21 d	1.00 e
<i>Bra021710</i>	1.33 cd	3.95 a	2.67 b	2.48 b	1.41 c	1.00 d
<i>Bra027246</i>	1.82 d	20.55 a	15.85 b	8.03 c	8.84 c	1.00 d
<i>Bra028691</i>	1.65 d	7.80 b	22.82 a	6.42 c	5.91 c	1.00 d
<i>Bra032610</i>	1.25 b	2.71 a	0.69 d	0.78 d	0.42 e	1.00 c
<i>Bra032631</i>	1.01 d	3.54 a	1.26 bc	1.39 b	1.14 cd	1.00 d
<i>Bra035604</i>	1.28 e	3.84 a	2.63 b	1.56 d	1.75 c	1.00 f
<i>Bra036646</i>	0.89 d	3.71 a	1.84 b	1.65 bc	1.26 bcd	1.00 cd
<i>Bra038691</i>	1.55 d	4.84 a	2.61 c	4.12 b	3.57 c	1.00 d

注: 基因的表达水平为 3 次重复的平均值, a、b、c 等小写字母代表 $P < 0.05$ 的差异性显著水平。

Note: The values indicate means of three biological replicates \pm SD, a, b, c, d represent significant differences determined at $P < 0.05$.

3 讨论

研究表明, CMS 系统几乎都是线粒体基因组中存在的特定的、“多余”的有害基因表达的结果 (吴豪 等, 2007)。对于恢复基因的作用机理, 有两类推测: 一是恢复基因抑制线粒体基因组特定 CMS 基因的表达; 另一类是恢复基因补偿或纠正 CMS 线粒体某个必需基因的功能缺陷。目前研究结果几乎都支持第一类机制。本研究中通过高通量测序分析, 在不育池和育性恢复池之间检测到的差异表达基因 84.39% 都是下调表达基因, 该结果支持了前人的第一类推测。研究表明植物雄性不育基因在表达过程中, 包括一系列的物质和能量代谢, 涉及各种复杂的生化反应 (孙日飞 等, 2000)。本研究所取样品为孢原细胞分化期到小孢子单核期, 受不育基因和核基因的共同影响, 该时期为育性变换的关键时期, 生化反应更加剧烈, 而生化反应对应的基因的表达必然也会大量上调表达。即与正常育性株相比, 不育系中与花粉败育产生相关的基因大量上调表达。当不育系中引入核恢复基因后, 核育性恢复基因调控细胞质中的不育因子, 不育因子被抑制, 由不育因子诱导的一系列上调表达的基因恢复正常表达, 因此与不育系相比恢复系下调表达基因的数量远远多于上调表达基因。

在本研究获得的差异表达基因中, 虽然下调表达基因总数远远多于上调表达基因, 但经过统计发现, 在高丰度差异表达的基因中, 上调表达基因数量要远远大于下调表达的基因。通过基因注释, 发现这些基因多为花粉发育过程中的关键基因, 这些基因一旦发生突变, 就会导致雄性不育。如 AMS (Xu et al., 2010; Ma et al., 2012)、MS1 (Takuya et al., 2007; Yang et al., 2007)、AtMYB103 (Zhang et al., 2007; Zhu et al., 2010)、MS2 (Zhang et al., 2005)、CYP703A2 (Marc et al., 2007) 及 ACOS5 (Clarice et al., 2009) 等。其中转录因子 AMS、ATA20、MS1、MYB、bHLH、MS2、

LTP、AAT、CAT、ABC 转运蛋白等均是花药发育调控网络中的成员 (Takuya et al., 2007; Yang et al., 2007; Zhang et al., 2007, 2010; Zhu et al., 2010; Ma et al., 2012), AMS 和 MS1 可能是核心并起着关键作用 (Xu et al., 2010; Wan et al., 2012)。因此本研究认为这些高丰度上调表达的基因在不育株中受到 *orf224* 的抑制, 表达水平远远低于可育株, 恢复基因抑制 *orf224* 的表达后, 这些花粉发育的关键基因则恢复到正常表达水平, 表现为上调表达。因此这些差异表达基因的数量在整个差异表达基因中所占的比例虽然不大, 但可能对育性的产生和恢复起到了重要的作用。因此本研究在进行 real-time qPCR 验证时, 选择以该类差异表达基因为主。

Real-time qPCR 验证中保持系的表达与其它所有材料不同。研究表明, 线粒体可以通过反向调控核基因的表达介导育性的改变 (杨景华和张明方, 2007)。因此推测本研究中该现象是保持系 N 型细胞质中线粒体基因差异表达的表现。保持系的核基因虽然与不育系相同, 恢复基因均为纯合的 *rfprfp*, 但两者的细胞质不同, 不育系比保持系多了一个开放的阅读框 ORFs。保持系中所有基因的上调表达, 可能正是由于正常细胞质与不育细胞核的调控模式, 不同于带有不育因子的细胞质与带有恢复基因的细胞核之间的调控模式造成的。

Pol CMS 是核质互作的结果, 由线粒体、叶绿体、核质 3 个遗传系统共同影响 (张海艳 等, 2004)。以往的研究, 大多是利用 cDNA - AFLP 技术分析保持系与不育系之间的差异表达 (马小定, 2007; 马勇 等, 2009; 吴智明 等, 2009)。然而, 由于大多数细胞质不育材料是通过远缘杂交或体细胞杂交而来的异源胞质, 采用不育系及其保持系进行比较研究, 获得的差异表达往往会分离到细胞质雄性不育“假基因” (杨景华和张明方, 2007), 如果利用恢复系则完全可以克服这个缺点。本研究第一次利用数字基因表达谱, 选用恢复系与不育系的 F₂ 代分离群体, 在大白菜全基因组范围内分析了不育系育性恢复后的差异基因的表达。结果表明 pol CMS 的线粒体不育基因 *orf224* 的表达被核恢复基因 *Rfp* 抑制后, 不育系中受 *orf224* 表达产物毒害而应激上调表达的基因可以被恢复基因下调表达, 而一些受 *orf224* 表达产物抑制低表达的关键基因则恢复原来的表达水平, 表现为上调表达。在育性恢复过程中, 涉及大量与物质、能量代谢、核酸修复与降解相关的基因参与, 以满足花粉发育对物质和能量的需求。通过 real-time qPCR 验证鉴定了 4 个与育性恢复密切相关的差异表达基因, 如果进一步克隆出这些基因, 并对这些基因分别从 DNA、RNA 水平以及时空表达进行研究, 可以明确这些基因在 pol CMS 花粉发育过程中的具体作用, 对进一步了解花药发育过程, 揭示雄性不育机理具有重要的理论指导意义。

References

- Audic S, Claverie J M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*, 7 (10): 986 - 995.
- Bellaou M, Martin- Canadell A, Pelletier G, Budar F. 1998. Low-copy-number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of *B. rassicaceae*: Relationship to reversion of the male sterile phenotype in some hybrids. *Mol Gen Genet*, 257: 177 - 185.
- Bellaou M, Grelon M, Pelletier G, Budar F. 1999. The restorer *Rfo* gene acts post-transnationally on the stability of the ORF138 Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed hybrids. *Plant Molecular Biology*, 40: 893 - 902.
- Benjamini Y, Yekutieli D. 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *The Annals of Statistics*, 29: 1165 - 1188.
- Brechenmacher L, Weidmann S, van Tuinen D, Chatagrier O, Gianinazzi S, Franken P, Gianinazzi Pearson V. 2004. Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza*, 14: 253 - 262.
- Clarice de Azevedo Souza, Sung Soo Kim, Stefanie Koch, Lucie Kienow, Katja Schneider, Sarah M McKim, George W Haughn, Erich Kombrink, Carl J Douglas. 2009. A novel fatty acyl-CoA synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21 (2): 507 - 525.
- Hao Gang-ping, Chen Min, Yang Qing. 2003. Progress of study on plant mitochondria and cytoplasmic male sterility. *Chinese Bulletin of Botany*,

- 5: 549 - 557. (in Chinese)
- 郝岗平, 陈敏, 杨清. 2003. 植物线粒体与细胞质雄性不育研究进展. 植物学通报, 5: 549 - 557.
- Hoth S, Morgante M, Sanchez J P, Hanafey M K, Tingey S V, Chua N H. 2002. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abil-1* mutant. *Journal of Cell Science*, 115: 4891 - 4900.
- Hu Yong-min, Dong Jun-gang, Meng Qian, Guo Ying-fen, Dong Zhen-sheng. 2012. Cytological observation on anther development of five CMS lines in *Brassica napus*. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 21 (7): 95 - 99. (in Chinese)
- 胡永敏, 董军刚, 孟倩, 郭英芬, 董振生. 2012. 5种甘蓝型油菜细胞质雄性不育系的细胞学观察. 西北农业学报, 21 (7): 95 - 99.
- Leving C S. 1996. Infertility treatment: A nuclear restorer gene in maize. *Science*, 272: 1279 - 1280.
- L'Homme Y, Stahl R J, Li X Q, Hameed A, Brown G G. 1997. *Brassica napus* cytoplasmic male sterility associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS-associated *orf224* gene. *Curr Genet*, 31 (4): 325 - 335.
- Liu Zhi, Liu Ping-wu, Long Fu-rong, Hong Deng-feng, He Qing-biao, Yang Guang-sheng. 2012. Fine mapping and candidate gene analysis of the nuclear restorer gene *Rfp* for pol CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 125: 773 - 779.
- Ma Xiao-ding. 2007. Analysis of differentially expressed genes between male sterile line and its maintainer line in double - recessive genic male sterile cotton (*Gossypium hirsutum* L.) during anther development [M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 马小定. 2007. 棉花双隐性细胞核雄性不育系与保持系花粉发育期差异表达基因分析[硕士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Ma Yong, Wu Jian-yong, Xing Chao-zhu, Guo Li-ping, Gong Yang-cang, Cui Ming-hui, Wang Hai-lin. 2009. Differentially expressed genes between cytoplasmic male sterility lines and maintainer lines of *Gossypium harknessii*. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (10): 3706 - 3712. (in Chinese)
- 马勇, 吴建勇, 邢朝柱, 郭立平, 巩养仓, 崔明晖, 王海林. 2009. 哈克尼西棉细胞质雄性不育系和保持系差异表达基因分析. 中国农业科学, 42 (10) : 3706 - 3712.
- Ma Xuan, Feng Bao-min, Ma Hong. 2012. AMS-dependent and independent regulation of anther transcriptome and comparison with those affected by other *Arabidopsis* anther genes. *BMC Plant Biology*, 12: 23 - 42.
- Marc Morant, Kirsten Jørgensen, Hubert Schaller, Franck Pinot, Birger Lindberg Møller, Danièle Werck-Reichhart, Søren Bak. 2007. CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-Chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *The Plant Cell*, 19 (5): 1473 - 1487.
- Menasza R, L'Homme Y, Brown G G. 1999. Post-transcriptional and developmental regulation of a CMS-associated mitochondrial gene region by a nuclear restorer gene. *The Hant*, 7 (5): 491 - 499.
- Moran P J, Cheng Y, Cassell J L, Thompson G A. 2002. Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51: 182 - 203.
- Shen Jin-xiong, Wan Zheng-jie, Jing Bing, Xiong Qiu-fang, Fu Ting-dong. 2008. Progress on molecular mechanisms of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rapeseed. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 30 (3): 374 - 383. (in Chinese)
- 沈金雄, 万正杰, 景兵, 熊秋芳, 傅廷栋. 2008. 油菜细胞质雄性不育及恢复的分子机理研究进展. 中国油料作物学报, 30 (3): 374 - 383.
- Sun Ri-fei, Fang Zhi-yuan, Zhang Shu-jiang, Li Fei, Niu Xin-ke, Wu Fei-yan. 2000. Biochemical analysis of cold tolerant Ogura CMS Chinese cabbage lines. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (3): 187 - 192. (in Chinese)
- 孙日飞, 方智远, 张淑江, 李菲, 钮心恪, 吴飞燕. 2000. 萝卜胞质大白菜雄性不育系的生化分析. 园艺学报, 27 (3): 187 - 192.
- Sorensen A M, Kröber S, Unte US, Huijser P, Dekker K, Saedler H. 2003. The *Arabidopsis* ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J*, 33: 413 - 423.
- Takuya Ito, Noriko Nagata, Yoshu Yoshida, Masaru Ohme-Takagi, Ma Hong, Kazuo Shinozaki. 2007. The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (MS1) gene encoding a PHD-type transcription factor regulates pollen exine development. *Plant Cell*, 19: 3549 - 3562.
- Wan Li-li, Hu Qin, Hong Deng-feng, Yang Guang-sheng. 2012. BnC15 and BnATA20, the different putative components, control anther development in *Brassica napus* L. *Gene*, 507 (1): 9 - 19.
- Wu Hao, Xu Hong, Liu Zhen-lan, Liu Yao-guang. 2007. Molecular basis of plant cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Chinese Bulletin of Botany*, 24 (3): 399 - 413. (in Chinese)
- 吴豪, 徐虹, 刘振兰, 刘耀光. 2007. 植物细胞质雄性不育及其育性恢复的分子基础. 植物学通报, 24 (3): 399 - 413.

- Wu Zhi-ming, Hu Kai-lin, Qiao Ai-min. 2009. Differential expression analysis in flower buds of CMS and its maintainer line of *Capsicum annuum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (9): 1311 - 1316. (in Chinese)
- 吴智明, 胡开林, 乔爱民. 2009. 辣椒胞质雄性不育系与保持系蕾期基因表达差异分析. *园艺学报*, 36 (9): 1311 - 1316.
- Xu Jie, Yang Caiyun, Yuan Zheng, Zhang Dasheng, Martha Y G, Ding Zhiwen, Liang Wanqi, Zhang Dabing, Wilson Z A. 2010. The *ABORTED MICROSPORES* regulatory network is required for post-meiotic male reproductive development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22: 91 - 107.
- Xu Ming-liang, Yang Jin-shui. 1995. Molecular basis of disease susceptibility and cytoplasmal male sterility in the T cytoplasm of maize. *Hereditas*, 17 (Supplement): 24 - 29. (in Chinese)
- 徐明良, 杨金水. 1995. 玉米 T 型胞质感病性及雄性不育性的分子基础. *遗传*, 17 (增刊): 24 - 29.
- Yang Cai-yun, Gema Vizcay-Barrena, Katie Conner, Wilson Zoe A. 2007. MALE STERILITY1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *The Plant Cell*, 19: 3530 - 3548.
- Yang Guang-sheng, Fu Ting-dong. 1991. A preliminary study on the restoring-maintaining relationship in rapeseed (*Brassica napus* and *Brassica campestris*). *Acta Agronomica Sinica*, 17 (2): 151 - 156. (in Chinese)
- 杨光圣, 傅廷栋. 1991. 油菜细胞质雄性不育恢保关系的初步研究. *作物学报*, 17 (2): 151 - 156.
- Yang Jing-hua, Zhang Ming-fang. 2007. Mechanism of cytoplasmic male-sterility modulated by mitochondrial retrograde regulation in higher plants. *Hereditas*, 29 (10): 1173 - 1181. (in Chinese)
- 杨景华, 张明方. 2007. 线粒体反向调控介导高等植物细胞质雄性不育发生机制. *遗传*, 29 (10): 1173 - 1181.
- Yang Na. 2011. Gene expression profiles of saline-alkali stress responses in leaves and roots of soybean [M. D. Dissertation]. Changchun: Jilin Agricultural University. (in Chinese)
- 杨娜. 2011. 盐碱胁迫下大豆根和叶的表达谱分析 [硕士学位论文]. 长春: 吉林农业大学.
- Yu Feng-qun, Fu Ting-dong. 1990. Cytomorphological research on anther development of several male-sterile lines in *Brassica napus* L. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 8 (3): 209 - 215. (in Chinese)
- 余凤群, 傅廷栋. 1990. 甘蓝型油菜几个雄性不育系花药发育的细胞形态学研究. *武汉植物学研究*, 8 (3): 209 - 215.
- Yuan Mei, Yang Guang-sheng, Fu Ting-dong, Li Yun. 2003. Transcriptional control of *orf224/atp6* by the pol CMS restorer *rfp* gene in *Brassica napus* L. *Genetica Sinica*, 30 (5): 469 - 473.
- Zhang De-shuang, Zhang Feng-lan, Xu Jia-bing, Yu Yang-jun, Zhao Xiu-yun, Wang Yong-jian, Fang Zhi-yuan. 2012. Electron microscopic study on male sterile CMS96 and maintainer line in Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali Sinica*, 27 (2): 133 - 139. (in Chinese)
- 张德双, 张凤兰, 徐家炳, 余阳俊, 赵岫云, 王永健, 方智远. 2012. 大白菜 CMS96 不育系和保持系电镜观察. *华北农学报*, 27 (2): 133 - 139.
- Zhang Hui, Liang Wan-qi, Yang Xi-jia. 2010. Carbon starved anther encodes a MYB domain protein that regulates sugar partitioning required for rice pollen development. *The Plant Cell*, 22 (3): 672 - 689.
- Zhang Hai-yan, Yu Yuan-jie, Zhou Yu-liang. 2004. Studies on biological mechanism of cytoplasmic male sterility in plants. *Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science*, 35 (1): 137 - 141. (in Chinese)
- 张海艳, 于元杰, 周玉亮. 2004. 植物细胞质雄性不育的生物学研究进展. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 35 (1): 137 - 141.
- Zhang Zai-bao, Jun Zhu, Gao Ju-fang, Wang Chen, Li Hui, Li Hong, Zhang Hui-qi, Zhang sen, Wang Dong-mi, Wang Quan-xi, Huang Hai, Xia Hui-jun, Yang Zhong-nan. 2007. Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 52: 528 - 538.
- Zhang Zheng-zhi, Ma Zheng-qiang, Liu Da-jun. 2005. Suppression subtractive hybridization analysis of Ms2 near-isogenic lines of wheat reveals genes differentially expressed in spikelets and anthers. *J Plant Physiol Mol Biol*, 31 (2): 175 - 182.
- Zhao Da-zhong, Wang Guan-fang, Brooke Speal, Ma Hong. 2002. The excess microsporocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev*, 16: 2021 - 2031.
- Zhu Jun, Zhang Guo-qiang, Chang Yu-hua. 2010. AtMYB103 is a crucial regulator of several pathways affecting *Arabidopsis* anther development. *Science China Life Sciences*, 53: 1112 - 1122.