

青花菜细胞质雄性不育相关 miRNA 的 鉴定与表达特征分析

裴徐梨¹, 荆赞革^{1,2}, 唐 征^{2*}, 冯鹏宇¹

(1 昆明学院 农学与生命科学学院, 昆明 650214; 2 温州科技职业学院 农业与生物技术学院, 浙江温州 325006)

摘 要: 植物 miRNA 是一类内源小分子 RNA, 在花粉发育和育性调控中具有重要作用。该研究利用高通量测序技术构建了青花菜细胞质雄性不育系及其保持系花蕾的 sRNA 文库, 并通过 qRT-PCR 技术检测育性相关的 miRNAs 及其预测靶基因的表达特征, 为深入探讨 miRNA 调控青花菜育性机制提供理论依据。结果表明: (1) 在青花菜中共鉴定到 181 个保守 miRNA 和 8 个新型 miRNA, 差异表达 miRNA 共 47 个, 其中 24 个已知 miRNAs 和 4 个新型 miRNAs 表达上调, 其余为表达下调; 发现 2 个差异 miRNA 只在不育系中表达, 7 个差异 miRNA 为保持系所特有。(2) 生物信息学分析表明, 共鉴定到 2 个关联的 miRNA-mRNA 对 [*miR859-1* 靶向的花粉外壁蛋白基因 (*T2/Unigene_BMK. 21608*) 和 *miR5174e-1* 调控的氨基酸通透酶基因 (*T2/Unigene_BMK. 31772*)], 2 个 miRNA 均负向调控相应的靶基因, 均可参与青花菜小孢子发育以及雄性不育的发生过程。(3) qRT-PCR 分析显示, *miR159a-1*、*miR164a-1*、*miR319a-1* 和 *miRn11* 在青花菜不育系中的表达量高于其保持系, 其中 *miR164a-1*、*miR319a-1* 和 *miRn11* 的表达水平随着花蕾的发育不育系逐渐降低, 而在保持系的表达呈上升趋势; *miR319a-1* 和 *miR397a-2* 在雄蕊中的表达量高, 而在其他部位的表达量较低, 且 *miR397a-2* 在青花菜不育系中的表达量显著低于保持系。研究推测, miRNA 可能是通过抑制雄性不育相关的 PPR 基因表达、调控 LAC 基因的表达以及调节激素和 Ca^{2+} 介导的信号转导通路等, 从而导致青花菜雄性不育的发生。

关键词: 青花菜; 细胞质雄性不育; miRNA; 表达特征

中图分类号: Q786; Q789

文献标志码: A

Identification and Expression Characteristic Analysis of miRNAs Related to Cytoplasmic Male Sterility in Broccoli

PEI Xuli¹, JING Zan'ge^{1,2}, TANG Zheng^{2*}, FENG Pengyu¹

(1 College of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, China; 2 College of Agriculture and Biotechnology, Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou, Zhejiang 325006, China)

Abstract: As endogenous small RNAs in plant, miRNAs can play important roles in pollen development and fertility regulation. In order to provide theoretical basis for further discussing miRNA-mediated regulatory mechanism of male sterility in broccoli, we constructed the sRNA libraries of cytoplasmic male sterile line and its maintainer line by high-throughput sequencing in this study. Meanwhile, the expression characteristics of fertility related miRNAs and their predicted target genes were detected by qRT-PCR

收稿日期: 2021-09-05; 修改稿收到日期: 2021-11-25

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY18C150006); 云南省地方本科高校 (部分) 基础研究联合专项 (2018FH001-044); 云南省科技厅基础研究专项青年项目 (2019-1-C-25318000002236); 温州市科技项目 (2019ZX007-2); 浙江省农业 (蔬菜) 新品种选育重大科技专项 (2021C02065)

作者简介: 裴徐梨 (1990—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为蔬菜分子生物学研究。E-mail: xuliP@163. com

* 通信作者: 唐 征, 硕士, 副教授, 研究方向为蔬菜遗传育种研究。E-mail: 749703278@qq. com

technology. The results showed that: (1) a total of 181 conserved and 8 novel miRNAs were identified in broccoli. Among them, 47 miRNAs were differentially expressed. 24 known miRNAs and 4 novel miRNAs were up-regulated and the rest were down-regulated. Two differentially expressed miRNAs were only expressed in sterile line, and seven differentially expressed miRNAs were specific to its maintainer line. (2) Bioinformatics analysis showed that two associated miRNA-mRNAs [*miR859-1* targeted pollen coat gene (*T2/Unigene_BMK.21608*) and *miR5174e-1* regulated amino acid permease gene (*T2_Unigene_BMK.31772*)] were identified. These two miRNAs could negatively regulate their corresponding target genes and participate in microspore development and male sterility occurrence in broccoli. (3) qRT-PCR analysis showed that the expression levels of *miR159a-1*, *miR164a-1*, *miR319a-1* and *miRn11* in male sterile line were higher than those in maintainer line. The expression levels of *miR164a-1*, *miR319a-1* and *miRn11* decreased with development of flower bud in sterile line, but increased in maintainer line; *miR319a-1* and *miR397a-2* were high expressed in stamen and low in other parts of flower buds, and the expression level of *miR397a-2* in sterile line was significantly lower than that in maintainers line. Our study speculated that miRNAs may lead to the occurrence of male sterility by inhibiting the expression of male sterility related PPR gene, regulating the expression of LAC gene and regulating hormone and Ca^{2+} mediated signal transduction pathway in broccoli.

Key words: broccoli; cytoplasmic male sterility; miRNA; expression characteristic

miRNA 是一类重要的内源性单链小分子 RNA^[1]。前人研究表明,miRNA 及其靶基因在花粉发育和育性调控中具有重要的作用^[2]。例如,*miR156* 可通过调节 SPL 转录因子的表达来影响拟南芥雄配子的产生^[3]; *miR159a-1* 能够抑制 MYB 基因的转录水平来调控花芽分化和植株育性^[4]; *miR172* 与其靶基因 (AP2 类基因) 共同调节拟南芥的开花时间和器官形成^[5]。近年来,利用高通量测序技术很多与植物育性相关的 miRNA 已被成功鉴定出来^[6-8]。

青花菜杂种优势非常明显。细胞质雄性不育系以其育性稳定、开花能力优良和杂交率高等优点已被广泛应用于青花菜杂交育种体系中。本研究利用 Illumina 测序技术构建了青花菜细胞质雄性不育系和保持系的 sRNA 文库,共鉴定到 47 个差异表达 miRNA。同时,通过 qRT-PCR 技术检测了部分 miRNA 及其靶基因的表达特征,本研究结果为进一步探讨 miRNA 调控青花菜育性提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以回交 8 代以上的青花菜 Ogu 细胞质雄性不育系 WN12-95A(MS)及其保持系 WN12-95B(FS)为试验材料。于花期采集长度小于 2 mm 的不育系和保持系花蕾用于高通量测序。采集不育系和保持系 3 个不同时期花蕾(长度 < 2 mm、2~4 mm、> 4 mm)以及保持系大于 4 mm 花蕾的不同部位(花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊)用于 qRT-PCR 分析。

1.2 试验方法

1.2.1 青花菜 sRNA 文库构建和 miRNA 的鉴定

从质量合格的总 RNA 中分离和纯化得到长度合适的 small RNA 进行文库构建,而后进行高通量测序。采用 SOAP2 将过滤得到高质量 clean read 比对到青花菜转录组参考序列^[8]。已知 miRNA 的鉴定通过 miRDeep2 软件比对到 miRBase 数据库;新型 miRNA 的预测则通过碱基延伸未比对的序列,再通过 MIREAP 软件进一步的筛选。

1.2.2 青花菜不育系和保持系差异 miRNA 的筛选 将 miRNA 表达水平进行归一化处理,使用归一化的数据计算 Fold Change(FC)和 *P* 值。差异表达 miRNA 的筛选以 $|\log_2(\text{FC})| \geq 1, P < 0.05$ 作为标准。

1.2.3 青花菜差异 miRNA 的靶基因预测及功能注释 使用 psRNA Target 软件进行潜在靶基因的预测^[9],错配小于 4 的基因被选为候选靶基因。同时基于 sRNA 和 mRNA 测序数据,采用关联分析的方法鉴定雄性不育相关差异表达基因^[10]与差异 miRNA 的关联网。

1.2.4 实时荧光定量分析差异 miRNA 及靶基因的表达特性 miRNA 及总 RNA 的提取和反转录均使用 TaKaRa 公司试剂盒。实时荧光定量参照 Xu 等的方法^[11],使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa 公司)在 ABI 7500(Applied Biosystems 公司)上运行。miRNA 反应程序为:95 °C 10 s,95 °C 5 s,60 °C 35 s,40 个循环。靶基因反应程序为:95 °C 30 s;95 °C 15 s,60 °C 1 min,40 个循环。基

表 1 qRT-PCR 引物信息
Table 1 Primer information for qRT-PCR

项目 Item	引物 Primer(5'→3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
<i>T2_Tnigene_BMK</i> . 18463(漆酶基因 Laccase gene)	GCAGGTTTCAGGAAGAAGA	ACAGAGGCAGAGTATTAAGTAA
<i>T2_Tnigene_BMK</i> . 17349 (CCCH 型 锌 指 蛋 白 基 因 CCCH-type zinc finger protein gene)	TGTAAGAAGAAGACGAACCT	CACCACCTAACCAAGACA
<i>T1_Unigene_BMK</i> . 33859 (N2, N2-二甲基鸟嘌呤 tRNA 甲基转移酶基因 N2, N2-dimethylguanine tRNA methyltransferase gene)	GGAACTACAGGACCAACT	CAATGAAGAACACTCCACTAA
靶基因 Target gene	<i>T2_Unigene_BMK</i> . 21255 (NAC 转录因子 NAC transcription factor)	AACCGCCAAGAATGAATG
	<i>T2_Unigene_BMK</i> . 12002(未知基因 Unknown gene)	TCATCAGCAGCATCATCA
	<i>T1_Unigene_BMK</i> . 25532(未知基因 Unknown gene)	TTCATCCTACTTATGTCACTGT
	<i>T2_Unigene_BMK</i> . 39435 (固醇载体蛋白 2 基因 Sterol carrier protein gene)	ACCTACATCGTTGATCTGAA
	<i>T2_Unigene_BMK</i> . 32543(未知基因 Unknown gene)	TGACATTGCTCGTGGTAT
	<i>U6</i>	GGGGACATCCGATAAAATTG
	<i>actin</i>	CTCATACGGTTCAGCGATA
	<i>miR397a-2</i>	TCATTGAGTGCAGCGTTGATGA
	<i>miR168a-4</i>	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAC
	<i>miR159a-1</i>	TTGGATTGAAGGGAGCTCCCT
	<i>miR164a-1</i>	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA
	<i>miRn11</i>	CTGATTTCGAGGGGGTCCC GTTGAAC
	<i>miRn4</i>	AGUUUGGUUAUUUUGGUCAGG
	<i>miRn16</i>	GCAGACCCUCUGACUCAGGCU
	<i>miR319</i>	TTGGACTGAAGGGAGCTCCCA

因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算。以 *U6* 和 *ac-tin* 基因分别作为 miRNA 及其靶基因的内参基因。试验所用引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 青花菜不育系和保持系 sRNA 数据分析

构建了青花菜雄性不育系和保持系花蕾的 2 个 sRNA 文库,共得到 47.88 M 原始数据(表 2)。过滤掉经接头序列和低质量序列后,分别获得 15.44 M(不育系)和 24.26 M(保持系)的 clean reads,分别占 Reads 总数的 76.6%和 87.5%。过滤后序列的总碱基对不育系和保持系分别为 351 525 505 bp 和 535 664 137 bp。

2.2 青花菜不育系和保持系 miRNA 的鉴定

青花菜不育系和保持系中共鉴定到 69 个家族中的 181 个已知 miRNA,包括 138 个保守 miRNA 和 43 个非保守 miRNA。其中 *miR156* 家族成员数最多,为 10 个,而大部分保守 miRNA 家族仅发现 1 个成员。*miR403* 和 *miR167* 表达丰度分别为 351 989 和 278 824,在 2 个样品中呈现高表达;而 *miR1520*、

表 2 青花菜不育系和保持系 sRNA 信息汇总
Table 2 Summary of small RNA sequences in male sterile line and its maintainer line of broccoli

类型 Type	不育系 Male sterile line	保持系 Maintainer line
Reads 总数 Total reads	20 157 770	27 737 409
接头序列 Adaptor sequence	266 792	27 711 823
极短序列 Very short sequence	4 180 465	3 397 588
极长序列 Very long sequence	534 371	80 089
干净读序 Clean reads	15 442 934	24 259 732
总碱基对 Total base pairs/bp	430 978 411	1 386 870 450
低质量序列 Low quality sequence/bp	16 629 269	415 203
过滤后序列 Filtered sequence/bp	351 525 505	535 664 137

miR529 和 *miR535* 的表达丰度均较低。

青花菜不育系和保持系中共鉴定到 8 个新型 miRNA(表 3),其中 1 个新型 miRNA 在保持系中特异性表达。对这些新型 miRNA 的基本信息进行分析,结果显示它们的最小自由能(the minimum free energy,MFE)为-40.70~-24.10 kcal/mol,长度介于 21 到 25 nt。

2.3 青花菜雄性不育相关 miRNA 的鉴定

通过比较 2 个文库中的 miRNA 的表达量,结果(图 1)发现,43 个已知 miRNA 和 4 个新型 miRNA 在青花菜不育系和保持系中差异表达。其中,24 个已知 miRNAs 和 4 个新型 miRNAs 表达上调,其余 miRNA 表达下调;6 个差异表达 miRNA 的差异倍数大于 8;2 个差异 miRNA 只在不育系中表达,7 个差异 miRNA 为保持系所特有。

2.4 青花菜差异表达 miRNA 的靶基因预测

利用 psRNA Target 软件共预测到 188 条靶序列。通过进一步的靶基因功能分析,发现其中一些靶基因是雄性不育发生和花粉发育过程中的转录因子。例如 AP2-like 转录因子、锌指结构域蛋白基

因、激素响应因子(auxin response factors 家族,ARF)和 SPL(squamosa promoter binding protein-like)结合蛋白基因等。同时,一些靶基因编码的磷酸甘油酸激酶、三角状五肽重复蛋白质、油质蛋白、谷氨酸脱羧酶和 γ -微管蛋白复合体等都是该过程中重要的生物蛋白。

图 2 显示,差异表达 miRNA 的靶基因经 GO 注释为 17 个生物学过程类目,10 个细胞成分类目和 11 个分子功能类目,表明这些靶基因参与了多种代谢和发育过程。KEGG 注释结果(图 3)将靶基因分为 23 个代谢途径,其中“植物病原菌的相互作用”(ko04626)、“N-糖链的合成”(ko00510)和“线粒体的脂肪酸延伸”(ko00062)为靶基因参与最多的途径。COG 注释结果(图 4)可将靶基因分为 19 个不同的

表 3 青花菜不育系和保持系中鉴定的新型 miRNA
Table 3 The novel miRNAs detected in male sterile line and maintainer line of broccoli

miRNA	序列 Sequence	长度 Length/nt	臂端 Arm	最小自由能 MFE (kcal/mol)
miRn1	AAAAGAUUGAGCCGAGUUUAAU	22	3'	-27.00
miRn4	AGUUUGGUUAUUUUGGUCAGG	21	3'	-40.70
miRn11	CUGAUUCGAGGGGGUCCGUUGAAC	25	3'	-25.90
miRn13	CUUACAUAUCUCAGGAGCUUU	21	3'	-28.60
miRn14	CUUCGUGUAAAUGAUUUUCCUU	22	3'	-33.30
miRn15	CUUUGCCUAUCGUUUGGAAAAG	22	5'	-37.10
miRn16	GCAGACCCUCUGACUCAGGCU	22	5'	-24.10
miRn21	UUGCUUAUUAGGUUCAGUGUUGGUG	25	5'	-29.9

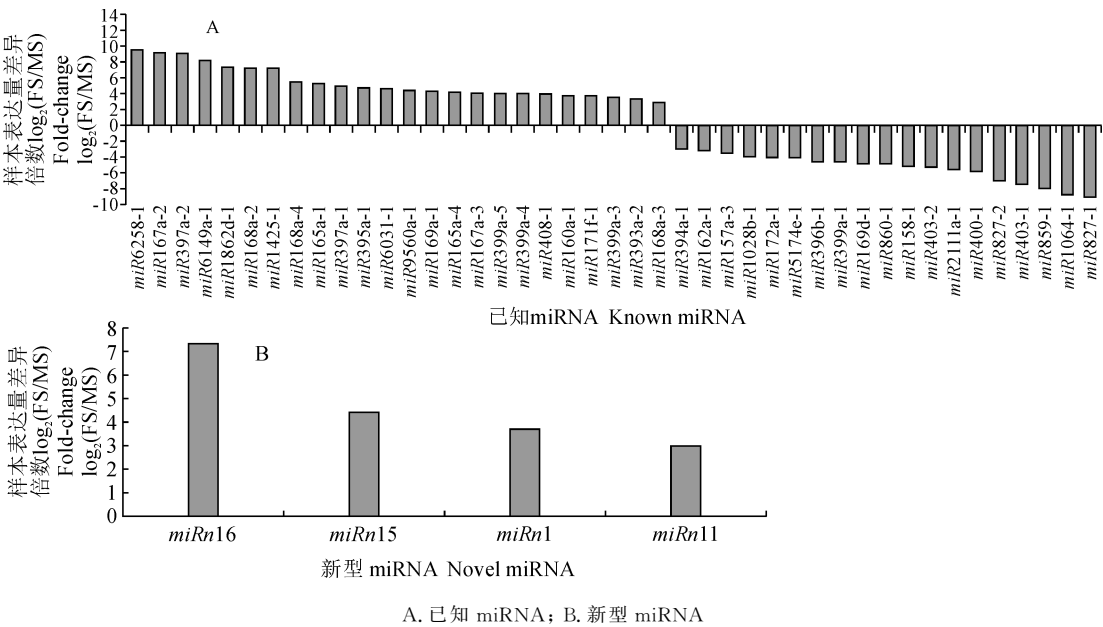


图 1 青花菜不育系(MS)和保持系(FS)差异 miRNA 表达量比较分析
Fig. 1 Comparative relative expressions of differentially expressed miRNAs in male sterile line (MS) and maintainer line (FS) of broccoli

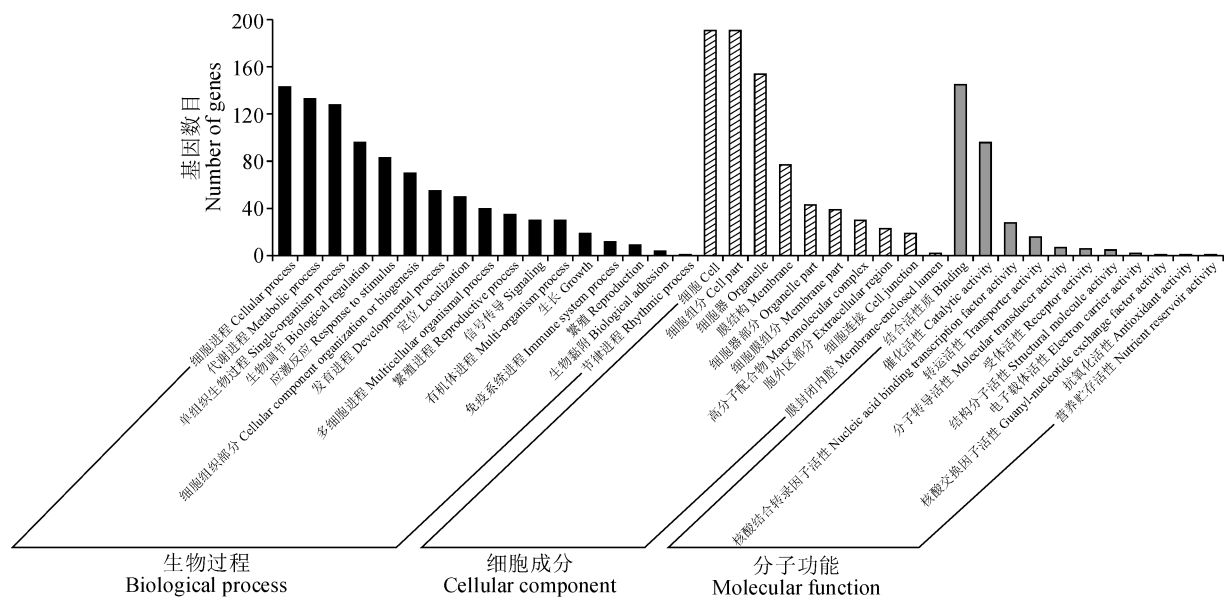


图 2 青花菜差异表达 miRNA 靶基因的 GO 注释

Fig. 2 Gene ontology analysis for target genes of differentially expressed miRNAs in broccoli

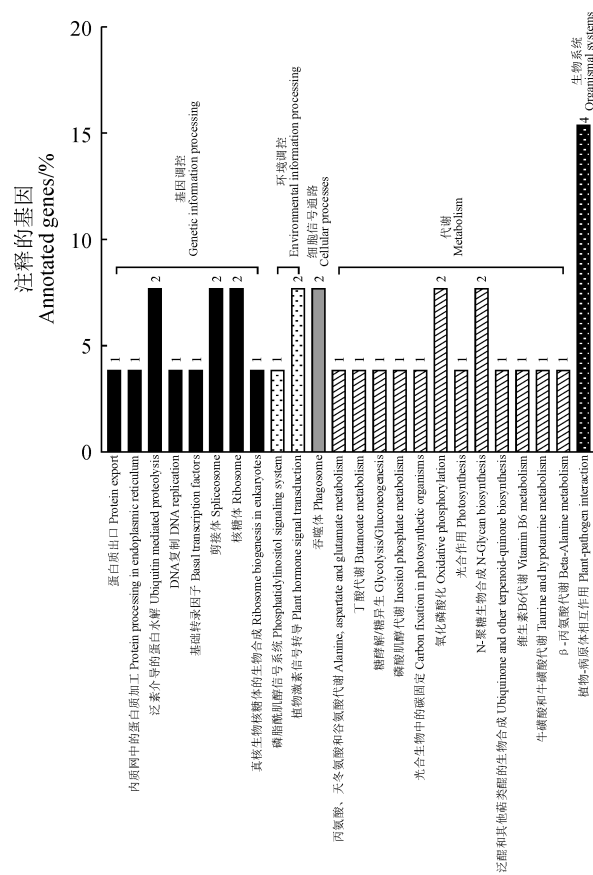


图 3 青花菜差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 注释

Fig. 3 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis for target genes of differentially expressed miRNAs in broccoli

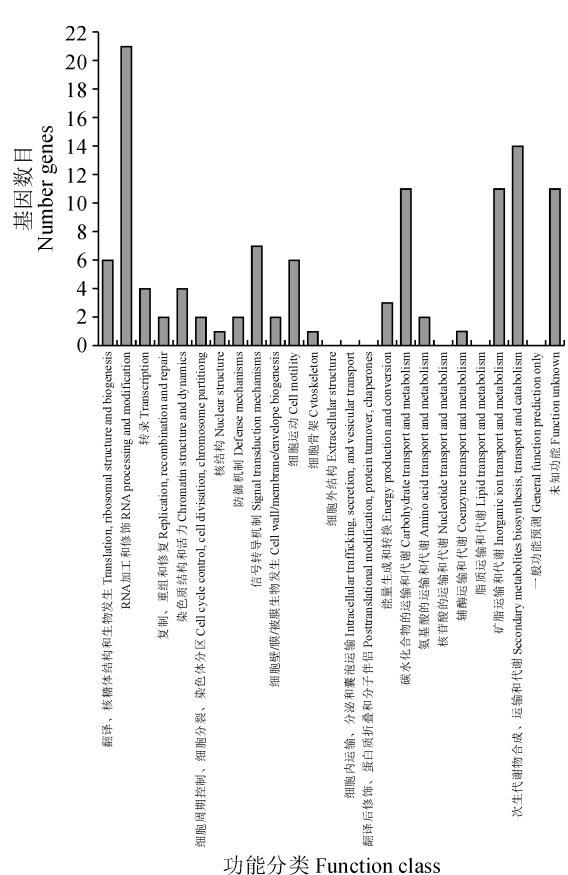


图 4 青花菜差异表达 miRNA 靶基因的 COG 注释

Fig. 4 Clusters of orthologous groups of proteins analysis for target genes of differentially expressed miRNAs in broccoli

功能类。其中属于“一般功能预测”类群的靶基因数最多(图 4)。

2.5 青花菜雄性不育相关 miRNAs 与 mRNAs 的关联分析

将本实验室的青花菜 sRNA 和 mRNA 数据进行关联分析,鉴定到 2 个关联的 miRNA-mRNA 对(*miR859-1/T2-Unigene_BMK.21608* 和 *miR5174e-1/T2-Unigene_BMK.31772*)(图 5,A)。分析发现 2 个 miRNA 均负向调控相应的靶基因(图 5,B)。对 miRNA 的靶基因进行注释发现, *miR859-1* 靶向的花粉外壁蛋白基因(*T2/Unigene_BMK.21608*)和 *miR5174e-1* 调控的氨基酸通透酶基因(*T2-Uni-*

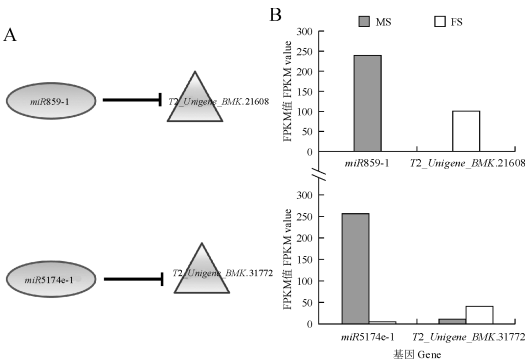
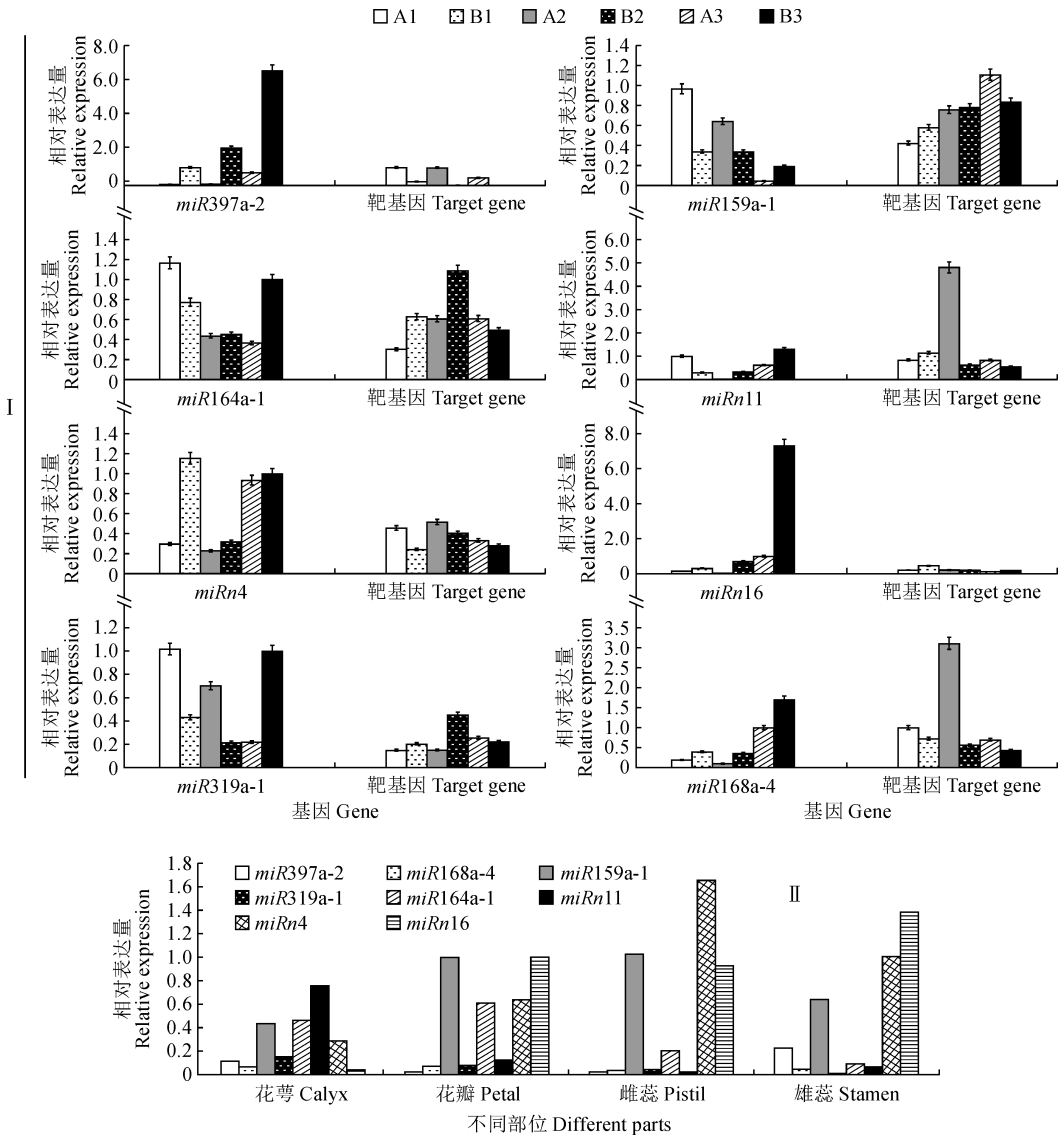


图 5 青花菜雄性不育相关 miRNAs 与 mRNAs 的关联分析(A)及表达特性(B)

Fig. 5 The association analysis (A) and expression patterns (B) of CMS-related miRNAs and mRNAs in broccoli



A. 不育系;B. 保持系;1,2,3 分别代表 < 2 mm、2~4 mm 和 > 4 mm 的花蕾

图 6 青花菜 miRNA 及其对应靶基因在不同发育时期花蕾和不同部位中的表达特征

A. Male sterile line; B. Maintainer line; 1, 2 and 3. were buds with length of < 2 mm, 2–4 mm, and > 4 mm, respectively
Fig. 6 Expression characteristics of miRNAs and their corresponding targets in different developmental stages and different parts of flower buds in broccoli

gene_BMK.31772)均可参与雄性不育的发生过程。

2.6 青花菜育性相关 miRNA 表达特性分析

选取青花菜育性相关的 8 个 miRNA(5 个已知 miRNA 和 3 个新型 miRNA)进行荧光定量 PCR 分析,在花蕾不同时期的表达模式分析结果(图 6, I)显示, *miR159a-1*、*miR164a-1*、*miR319a-1* 和 *miRn11* 在不育系(A1)中的表达量高于保持系(B1)。其中,*miR164a-1*、*miR319a-1* 和 *miRn11* 的表达水平随着不育系花蕾的发育逐渐降低,但在保持系花蕾中的表达量随着花蕾发育呈现上升趋势;*miR159a-1* 的表达量在不育系和保持系花蕾发育初期均最高,以后表达量逐渐下降。此外,*miR397a-2*、*miR168a-4*、*miRn4* 和 *miRn16* 在保持系中上调表达,但表达模式各有差异。*miRn4* 在不育系花蕾中的表达量逐渐增加,在保持系中表达趋势相反;其余 3 个 miRNA 在不育系和保持系中的表达趋势一致。同时,进一步比较靶基因和 miRNA 的表达特性后,结果发现 miRNA 与其对应的靶基因基本呈现相反的表达趋势。

由图 6, II 可以看出, *miR168a-4*、*miR159a-1*、*miR164a-1* 和 *miRn4* 在青花菜不同部位均有表达,且表达量差异不大;*miR319a-1* 在雄蕊中的表达量最高,在花萼、花瓣和柱头中的表达量降低;*miRn11* 在花萼中的表达量明显高于其他组织,而与之相反, *miRn16* 在花萼中的表达量极低;*miR397a-2* 在雄蕊中表达量最高,但在花瓣和柱头中几乎不表达,推测其具有组织特异性。

3 讨 论

miRNA 的基本特征分析是了解其调控作用的基础。本试验中 sRNA 的长度分析结果符合植物 miRNA 的特征。然而,青花菜的 23 nt miRNAs 的数量高于 21 nt miRNAs,表明这些 miRNA 调控育性的机制可能具有其特点。近年来,大量研究表明已知 miRNA 通常具有较高的表达水平,且其功能在植物进化中较保守。而新型 miRNA 的表达量明显低于保守 miRNA。在本研究中鉴定到的青花菜 miRNA 也存在此现象。

3.1 青花菜表达上调 miRNA 的调控机制探讨

植物雄性不育的发生是一系列相关 miRNA 参与的结果。本研究共鉴定到 29 个上调表达的 miRNA,其中 *miR397a-2* 靶向 laccase-like 转录因子。该转录因子能够调控植物发育过程中油菜素内酯的信号转导。油菜素内酯作为雄性不育发生的重要因子,其含量升高可降低拟南芥花粉的释放效率^[12]。此外,上调表达水稻 *OsLAC*(laccase-like gene)基因可导致部分雄性不育^[13]。本试验中 *miR397a-2* 在青花菜不育系中的表达量显著低于保持系,因此推测 *miR397a-2* 可能是通过调控 LAC 基因的表达来参与青花菜的雄性不育发生。

激素响应因子(ARF 类基因)在大豆中可以通过结合激素响应启动子调控花粉发育。*miR395* 的靶基因中就有 *ARF3*(auxin response factor 3),且该 miRNA 在保持系中的表达量高出不育系 4.7 倍。因此,推测 *miR395* 能够通过调节激素介导的信号转导来影响青花菜的育性。

3.2 青花菜表达下调 miRNA 的调控机制探讨

miRNA 与其靶基因相互作用来调控花粉发育^[14]。*miR156* 通过介导 SBP-box 基因来调控花粉发育。在拟南芥中,过表达 *SPL* 可以保护花粉育性^[3]。青花菜 *miR156* 在不育系中高表达,推测 *miR156* 可能通过调控 SBP-box 基因的表达来影响其育性。三角状五肽重复蛋白(pentatricopeptide repeat gene, PPR)在 RNA 编辑中具有重要功能。*miR158*、*miR400*、*miR859* 和 *miR5067* 均靶向 PPR 基因,且在青花菜保持系中的表达量低于不育系。现有研究表明 PPR 基因可使萝卜育性恢复^[15-18]。因此,我们推测 miRNA 抑制雄性不育相关的 PPR 基因的表达是青花菜雄性不育发生的可能原因之一。

Ca²⁺ 运输功能障碍可影响花粉发育。钙/钙调依赖性蛋白激酶是钙离子流入细胞的调节器^[19]。预测靶向钙/钙调依赖性蛋白激酶基因的 *miR399* 在青花菜保持系中下调表达,推测其在不育系中的高表达引起花粉发育过程中钙稳态的失调和 Ca²⁺ 介导的信号通路的减弱,从而导致雄性不育的发生。

参考文献:

[1] VOINNET O. Origin, biogenesis, and activity of plant Mi-

croRNAs[J]. *Cell*, 2009, **136**(4): 669-687.

[2] WEI M M, WEI H L, WU M, *et al.* Comparative expression

- profiling of miRNA during anther development in genetic male sterile and wild type cotton[J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13: 66.
- [3] XING S P, SALINAS M, HÖHMANN S, *et al.* miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2012, **22**(12): 3 935-3 950.
- [4] ACHARD P, HERR A, BAULCOMBE D C, *et al.* Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA[J]. *Development* (Cambridge, England), 2004, **131**(14): 3 357-3 365.
- [5] GLAZIŃSKA P, ZIENKIEWICZ A, WOJCIECHOWSKI W, *et al.* The putative miR172 target gene InAPETALA2-like is involved in the photoperiodic flower induction of *Ipomoea nil* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, **166**(16): 1 801-1 813.
- [6] DING X L, LI J J, ZHANG H, *et al.* Identification of miRNAs and their targets by high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B of soybean[J]. *BMC Genomics*, 2016, **17**(1): 1-16.
- [7] WEI X C, ZHANG X H, YAO Q J, *et al.* The miRNAs and their regulatory networks responsible for pollen abortion in Ogura-CMS Chinese cabbage revealed by high-throughput sequencing of miRNAs, degradomes, and transcriptomes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 894.
- [8] LI R Q, YU C, LI Y R, *et al.* SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment[J]. *Bioinformatics*, 2009, **25**(15): 1 966-1 967.
- [9] DAI X B, ZHUANG Z H, ZHAO P X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release)[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, **46**(W1): W49-W54.
- [10] PEI X L, JING Z G, TANG Z, *et al.* Comparative transcriptome analysis provides insight into differentially expressed genes related to cytoplasmic male sterility in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 217: 234-242.
- [11] XU L, WANG Y, XU Y Y, *et al.* Identification and characterization of novel and conserved microRNAs in radish (*Raphanus sativus* L.) using high-throughput sequencing[J]. *Plant Science*, 2013, 201-202: 108-114.
- [12] YE Q Q, ZHU W J, LI L, *et al.* Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, **107**(13): 6 100-6 105.
- [13] ZHANG Y C, YU Y, WANG C Y, *et al.* Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(9): 848-852.
- [14] ZHANG W, XIE Y, XU L, *et al.* Identification of microRNAs and their target genes explores miRNA-mediated regulatory network of cytoplasmic male sterility occurrence during anther development in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1 054.
- [15] WANG D K, LIU H Q, ZHAI G W, *et al.* OspTAC2 encodes a pentatricopeptide repeat protein and regulates rice chloroplast development[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2016, **43**(10): 601-608.
- [16] FUJII S, SMALL I. The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes[J]. *New Phytologist*, 2011, **191**(1): 37-47.
- [17] YASUMOTO K, TERACHI T, YAMAGISHI H. A novel Rf gene controlling fertility restoration of Ogura male sterility by RNA processing of orf138 found in Japanese wild radish and its STS markers[J]. *Genome*, 2009, **52**(6): 495-504.
- [18] OKUDA K, NAKAMURA T, SUGITA M, *et al.* A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(49): 37 661-37 667.
- [19] NAFZGER S, ROUGIER J S. Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase CASK modulates the L-type calcium current[J]. *Cell calcium*. 2017, 61: 10-21.

(编辑:裴阿卫)