



苜蓿雄性不育系 MS-4 SSH 文库构建 及基因表达分析

高翠萍¹, 石凤翎^{1*}, 伊风艳², 唐芳¹, 赵彦¹, 蔡丽艳³

(1 内蒙古农业大学 草地资源教育部重点实验室, 呼和浩特 010011; 2 内蒙古自治区农牧业科学院, 呼和浩特 010031; 3 内蒙古自治区林业监测规划院, 呼和浩特 010020)

摘 要:以苜蓿雄性不育系 MS-4 与可育系花蕾为材料, 利用抑制性消减杂交 (SSH) 技术, 分别构建了不育条件下和可育条件下基因差异表达消减 cDNA 文库, 在 2 个库中分别随机挑选阳性克隆进行测序, 经序列比对分析, 共获得功能已知的 EST 序列 190 条。后经 GO 功能分类, 对推定出的 6 个相关基因进行荧光定量 PCR 分析。结果表明: 6 个基因在苜蓿雄性不育系花蕾不同发育时期中均出现差异表达, 推测这 6 个基因可能与苜蓿雄性育性相关, 并且在其育性转换中具有重要作用。

关键词:苜蓿; 雄性不育性; SSH 文库; 基因表达量

中图分类号: Q781; Q789 **文献标志码:** A

Construction of SSH Library and Analysis of Expressed Genes in Male Sterile Line MS-4

GAO Cuiping¹, SHI Fengling^{1*}, YI Fengyan², TANG Fang¹, ZHAO Yan¹, CAI Liyan³

(1 Key Laboratory of Grassland Resources, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010011, China; 2 Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Science, Huhhot 010031, China; 3 Inner Mongolia Institute of Forestry Monitoring of Planning, Huhhot 010020, China)

Abstract: The buds of male sterile line of alfalfa MS-4 and its maintainer were taken as materials, employed the suppression subtractive hybridization (SSH) technology. Two differential gene expression subtractive cDNA libraries were constructed under sterile and fertile conditions. Positive clones were randomly selected to sequence and analyze by Blast. 190 ESTs with known functions were got. 6 genes were inferred which may be associated with male fertility of alfalfa by GO functional classification. The expression of 6 genes were analyzed by fluorescence quantitative PCR, the results showed 6 genes had differential expression at different development stages in the male sterile line of alfalfa. It suggested that these 6 genes may be related to the male fertility of alfalfa, and play an important role in fertility transformation.

Key words: alfalfa; male sterile; SSH; gene expression

利用雄性不育系进行杂交制种是杂种优势利用的重要途径, 目前, 已在小麦、棉花、谷子、红麻、大白

菜等多种植物中进行了生产利用^[1-5]。苜蓿作为畜牧业发展中的重要牧草, 面临现阶段缺乏优良苜蓿

收稿日期: 2017-02-05; 修改稿收到日期: 2017-03-26

基金项目: 国家自然科学基金 (31302020)

作者简介: 高翠萍 (1978—), 女, 博士, 主要从事牧草遗传育种研究。E-mail: gcp1978@126.com

* 通信作者: 石凤翎, 教授, 博士生导师, 主要从事牧草遗传育种研究。E-mail: sfl0000@126.com

品种的问题,获得生产上能利用的优良杂交种是迫切需要解决的问题。雄性不育系是杂种优势利用的重要材料。1978 年,内蒙古农业大学发现苜蓿雄性不育系 MS-4,由于其雌蕊育性低,生产上一直未大面积利用,探讨其不育机理及生产无法利用的限制因素是现阶段研究的主要内容。近年来,随着分子生物学技术的发展,植物雄性不育机理的研究有了突飞猛进的发展,一些作物中已找到不育基因和恢复基因^[6],但从总体上看,目前对雄性不育机理的认识还不够清楚,特别是对不育基因的定位及其产物的作用,以及对小孢子发生和发育的影响等,还需深入研究^[7-9]。本实验采用已在许多作物上利用的 SSH 技术,通过构建差减文库及序列分析,研究苜蓿雄性不育性相关功能基因,分析代谢途径,以期苜蓿雄性不育育种提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以‘草原 1 号’杂花苜蓿(*Medicago varia* Martin. cv. ‘Caoyuan No. 1’)雄性不育系 MS-4 为研究材料,MS-4 与相应的可育系(‘草原 1 号’杂花苜蓿)杂交,以‘草原 1 号’杂花苜蓿(可育株)为父本回交 2 次,筛选杂交后代的不育株与可育株构成近等基因系。选取可育株与不育株 3 个发育时期的花蕾(小孢子单核期、双核期、花粉成熟期),将‘草原 1 号’杂花苜蓿、F₁、BC₁ 和 BC₂ 可育株各时期的花蕾混合构成可育基因池,不育系 MS-4、F₁、BC₁ 和 BC₂ 不育株各时期的花蕾混合构成不育基因池,用于提取 RNA。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 花蕾总 RNA 提取采用植物总 RNA 提取试剂盒(Autolab 中国),取 100 mg 左右花蕾液氮研磨后,按其说明书进行提取,提取后溶于 250 μ L Nuclease-free Water(Promega),取 2 μ L RNA 电泳检测纯度和浓度。

1.2.2 抑制消减杂交与消减 cDNA 文库的构建 抑制消减杂交依照 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech,美国)进行。以不育条件下的花蕾为消减杂交实验方(Tester),可育条件下的花蕾作为驱动方(Driver),构建不育条件下特异表达基因的 cDNA 文库(以下简称 B 库);以可育条件下的花蕾为消减杂交实验方(Tester),不育条件下的花蕾作为驱动方(Driver),构建可育条件下特异表达基因的 cDNA 文库(以下简称 K 库)。

消减杂交产物经过纯化浓缩,与 pGEM-T 载体(Promega,美国)连接,连接产物经热激转化到感受态细胞 TOP10 中,转化后的细胞加 500 μ L 含 10 mmol/L Mg²⁺ 的 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 震荡培养 1 h,然后将培养后的细胞菌液完全涂于含羧苄青霉素(50 mg/L)的 LB 固体培养基中,每个平皿涂 50 μ L,每个文库涂 12 块平皿,37 $^{\circ}$ C 静止培养过夜。挑取单克隆菌斑于 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 静止培养 5 h。利用 M13F 和 M13R 引物进行 PCR 检测片段的插入情况,构成 SSH-cDNA 文库。

1.2.3 质粒提取与测序 按照质粒提取试剂盒(Autolab,中国)进行质粒提取,利用微量紫外分光光度计检测质粒的浓度和纯度。以 pGEM-T 载体的 M13F 和 M13R 启动子引物为测序引物,采用 3730XL 配合 BigDye V3.1 版本试剂进行测序。

1.2.4 序列分析 所获的序列去除载体和接头序列,采用 NCBI 的 Blastx 在线序列比对工具,对非冗余蛋白质数据库进行同源性检索分析。

1.2.5 基因表达分析 以苜蓿雄性不育系 MS-4 和可育系花蕾为研究材料,分别在小孢子发育的 3 个时期:单核期(花蕾<2 mm)、双核期(花蕾 2~4 mm)和花粉粒成熟期(花蕾>4 mm),采集花蕾。从已构建的差减文库中,随机选取 6 个花发育相关的差异基因,以紫花苜蓿的 *Actin 2* 基因(gi | 378407815)为内参基因,进行 qRT-PCR 分析,检测差异片段在不育系和可育系花蕾不同发育时期表达量差异。

2 结果与分析

2.1 SSH-cDNA 文库的构建

从不育和可育的 SSH-cDNA 文库中,分别随机挑取阳性克隆进行测序。B 库中获得的 587 条 EST 中最短的 69 bp,最长的 1 107 bp,片段平均长度 429 bp,去除低质量序列及重复序列后,共获得 513 条 EST。片段平均长度 377 bp,去除低质量序列及重复序列后,共获得 243 条 EST。利用 Blastx 同 GenBank 的非冗余蛋白质数据库进行同源性检索分析发现,B 库中的 513 条 EST 中 147 条功能已知,占全部 EST 的 28.7%;K 库中 243 条 EST 中 43 条功能已知,占全部 EST 的 17.7%。

利用 GenBank 非冗余核酸数据库和 dbEST 数据库,对功能未确定的 EST 序列进行同源分析,结果(表 2)发现,B 库中有 486 条可以找到同源序列(表 1),K 库中有 141 条可以找到同源序列,多数与

表 1 B 库部分测序克隆的 Blast 结果

Table 1 Blast search results of some sequenced ESTs in B tool

克隆 Clone No.	长度 Length	同源性比对结果 Result	来源 Source	E 值 E-value
B23	671	抗病反应蛋白 1 Disease resistance response protein 1	<i>Glycine max</i>	1.90e-23
B48	454	磷酸丙糖异构酶 Triosephosphate isomerase	<i>G. max</i>	9.13e-54
B49	325	酸性磷酸酶 Acid phosphatase	<i>G. max</i>	4.31e-20
B161	994	类枯草杆菌蛋白酶 Subtilisin-like protease	<i>G. max</i>	2.35e-38
B257	618	功能候选抗性蛋白 KR1 Functional candidate resistance protein KR1	<i>G. max</i>	6.47e-33
B286	243	果胶裂解酶前体 Pectate lyase precursor	<i>G. max</i>	4.83e-27
B409	491	光系统 I 亚基 PSAD Photosystem I subunit PSAD	<i>G. max</i>	5.22e-59
B410	320	类黄酮 3'-羟化酶 Flavonoid 3'-hydroxylase	<i>G. max</i>	8.49e-08
B425	442	泛素载体蛋白 4 Ubiquitin carrier protein 4	<i>G. max</i>	2.01e-76
B464	459	黄酮醇合成酶 Flavonol synthase	<i>G. max</i>	4.46e-72
B25	986	半胱氨酸蛋白酶 Cysteine protease	<i>Medicago sativa</i>	4.02e-115
B99	382	组蛋白 H3(AA 1-123)Histone H3 (AA 1-123)	<i>M. sativa</i>	6.02e-38
B157	244	环境胁迫诱导蛋白 Environmental stress-induced protein	<i>M. sativa</i>	6.16e-06
B191	328	过氧化物酶 Peroxidase	<i>M. sativa</i>	4.39e-57
B314	494	1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	<i>M. sativa</i>	7.94e-63
B374	337	蔗糖合酶 Sucrose synthase	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>falcata</i>	2.39e-58
B8	297	EF-hand 钙结合蛋白基因 Calcium-binding EF-hand	<i>Medicago truncatula</i>	1.05e-50
B333	582	MADS box 家族基因 MADS_MEF2_like	<i>M. truncatula</i>	2.04E-54
B37	427	核糖体蛋白 S21e Ribosomal protein S21e	<i>M. truncatula</i>	1.76e-37
B500	236	三磷酸腺苷双磷酸酶蛋白 Apyrase-like protein	<i>M. truncatula</i>	8.60e-24
B82	245	体细胞胚胎发生受体激酶类蛋白 2 Somatic embryogenesis receptor ki-nase-like protein 2	<i>M. truncatula</i>	8.48e-40
B95	366	丙二烯氧化物合酶 Allene oxide synthase	<i>M. truncatula</i>	1.73e-32
B133	540	线粒体内膜转位酶亚基的酶切进口 tim17/22 Mitochondrial import inner membrane translocase, subunit tim17/22	<i>M. truncatula</i>	3.11e-56
B136	241	核糖体蛋白 S10 Ribosomal protein S10	<i>M. truncatula</i>	4.83e-35
B143	533	硫氧还蛋白折叠 Thioredoxin fold	<i>M. truncatula</i>	3.34e-63
B154	598	肽酶,半胱氨酸肽酶活性位点 Peptidase, cysteine peptidase active site	<i>M. truncatula</i>	5.75e-100
B176	571	NADPH 氧化酶 2 Respiratory burst oxidase 2	<i>M. truncatula</i>	1.14e-89
B184	298	核糖体蛋白 S6e Ribosomal protein S6e	<i>M. truncatula</i>	9.20e-42
B212	499	β-葡萄糖苷酶的 G3 β-glucosidase G3	<i>M. truncatula</i>	7.85e-50
B214	827	PHD6	<i>M. truncatula</i>	5.24e-91
B217	269	MtN30	<i>M. truncatula</i>	9.80e-44
B220	428	转录因子 B3 Transcriptional factor B3	<i>M. truncatula</i>	7.72e-09
B287	535	过氧化物酶体的生物合成因子 11 Peroxisomal biogenesis factor 11	<i>M. truncatula</i>	1.55e-44
B297	505	颗粒体蛋白;肽酶 C1A;木瓜蛋白酶 Granulin; Peptidase C1A;Papain	<i>M. truncatula</i>	1.15e-83
B336	477	环氧化物水解酶 Epoxide hydrolase	<i>M. truncatula</i>	1.31e-64
B369	470	肽酶 T2,门冬酰胺酶 2 Peptidase T2, asparaginase 2	<i>M. truncatula</i>	1.48e-73
B380	288	苹果酸氧化还原酶 Malic oxidoreductase	<i>M. truncatula</i>	5.45e-39
B423	394	β-葡萄糖苷酶 G1 β-glucosidase G1	<i>M. truncatula</i>	7.48e-36
B9	635	衰老诱导叶绿体保持绿色蛋白 Senescence-inducible chloroplast stay-green protein	<i>Pisum sativum</i>	1.69e-47
B30	424	混合醇合酶 Mixed-amyrin synthase	<i>P. sativum</i>	5.16e-29
B32	719	PNDKN1	<i>P. sativum</i>	2.15e-39

续表 1 Continued Table 1				
克隆 Clone No.	长度 Length	同源性比对结果 Result	来源 Source	E 值 E-value
B511	594	NADH 脱氢酶 Putative NADH-dehydrogenase	<i>P. sativum</i>	1.04e-69
B64	379	翻译延伸因子 1B β Translational elongation factor 1 subunit B beta	<i>P. sativum</i>	1.40e-18
B415	547	DNA 结合蛋白 DF1 DNA-binding protein DF1	<i>P. sativum</i>	1.58e-23
B445	420	MADS box 蛋白 Aga MADS box protein Aga	<i>Lotus japonicus</i>	3.86E-24
B190	335	MADS FLC 相关蛋白 3 MADS FLC-like protein 3	<i>Cichorium intybus</i>	4.29E-07

表 2 K 库部分测序克隆的 Blast 结果

Table 2 Blast search results of some sequenced ESTs in K tool

克隆 Clone No.	长度 Length	同源性比对结果 Results	来源 Source	E 值 E-Value
K34	389	酰基辅酶 A 氧化酶 Acyl-CoA oxidase	<i>G. max</i>	8.84e-58
K61	445	AUX / IAA 蛋白 Aux/IAA protein	<i>G. max</i>	2.31e-43
K113	333	过氧化物酶体乙醇酸氧化酶 Peroxisomal glycolate oxidase	<i>G. max</i>	8.63e-24
K31	481	核糖体蛋白 L32 Ribosomal protein L32	<i>M. sativa</i>	2.45e-58
K136	986	假定的果胶酯酶花粉特异 cDNA(P65) Pollen-specific cDNA (P65) encoding a putative pectin esterase	<i>M. sativa</i>	1.99e-114
K89	620	鲨烯环氧化酶 Squalene epoxidase	<i>M. sativa</i>	3.53e-87
K126	514	黄烷酮-3-羟化酶 Flavonone-3-hydroxylase	<i>M. sativa</i>	6.80e-92
K174	462	假定防御素前体 2.1 Putative defensin 2.1 precursor	<i>M. sativa</i>	2.79e-37
K10	424	三磷酸腺苷双磷酸酶蛋白 Apyrase-like protein	<i>M. truncatula</i>	2.71e-70
K215	234	<i>GT4</i>	<i>M. truncatula</i>	8.59e-40
K226	234	<i>NIP2</i>	<i>M. truncatula</i>	8.32e-35
K39	412	过氧化物酶 Peroxidase	<i>M. truncatula</i>	2.43e-47
K108	489	肽酶、半胱氨酸肽酶的活性位点 C2 Peptidase, cysteine peptidase active site C2	<i>M. truncatula</i>	1.10e-77
K120	524	根瘤素 Nodulin	<i>M. truncatula</i>	3.22e-31
K123	446	甲羟戊酸和半乳糖 Mevalonate and galactokinase	<i>M. truncatula</i>	2.57e-18
K143	188	蛋白激酶 Protein kinase	<i>M. truncatula</i>	6.61e-29
K239	285	糖苷酶家族基因 1 Glycoside hydrolase family 1	<i>M. truncatula</i>	2.22e-48

蒺藜苜蓿或大豆的 cDNA 克隆同源。与其他物种同源性较低或者比对结果无意义的 ESTs 所代表的可能是新基因,B 库中共 127 个,占 24.8%,K 库中共 101 个,占 41.6%。B 库已知基因中,包括了一些与花发育相关的基因,如 MADS。

2.2 不育条件下 EST 序列的功能分析

根据 B 库中 EST 序列 Blastx 比对结果,利用 GO 数据库对 147 条 EST 进行功能注释发现,与线粒体有关的 EST 占 1.2%,与叶绿体有关的 EST 占 4.7%,与细胞质有关的共占 34.1%;进一步对 B 库 EST 进行分类(表 3),将其分为 13 大类,包括基础代谢、胁迫应答、蛋白活性、转运、翻译、发育、信号转导等,其中参与基础代谢的 ESTs 最多,共 43 个,占功能已知 ESTs 的 29.3%。脂氧合酶-9、丙二烯氧化物合酶等参与了脂质代谢,蔗糖合酶、葡萄糖焦磷酸化酶、 β -葡萄糖苷酶 G3 等参与了碳水化合物的代谢,

表 3 B 库 147 个 ESTs 功能分类及比例		
Table 3 Percentage distribution of the 147 ESTs in B tool based on the functional classes		
功能分类 Functional class	数量 Number	比例 Percent/%
基础代谢 Primary metabolism	43	29.3
胁迫应答 Stress response	7	4.8
蛋白活性 Protein activity	22	15.0
翻译 Translation	2	1.4
转录 Translation	6	4.1
发育 Development	2	1.4
蛋白结合 Protein binding	5	3.4
转运 Transcription	2	1.4
蛋白折叠 Protein foiding	2	1.4
信号转导 Signal transduction	1	0.7
其他 Others	14	9.5
未知功能 Function unknown	10	6.8
未找到 Not found	31	21.1

亲环素类肽基脯氨酰顺反异构酶、Pro 氨肽酶、丝氨酸羧基肽酶等参与了蛋白代谢。参与胁迫应答的 ESTs 有 7 个,包括盐胁迫,辐射等胁迫应答反应,有 2 个 ESTs 参与了植物发育过程,包括花发育与再生。31 个 ESTs 未找到匹配结果。

2.3 可育条件下 EST 序列的功能分析

根据 K 库中 EST 序列 Blastx 比对结果,利用 GO 数据库对 43 条 EST 进行功能分析发现,与细胞质有关的共占 27.3%,进一步对 K 库 EST 进行分类(表 4),将其分为 9 大类,包括基础代谢、胁迫应答、蛋白活性、翻译、转录和发育等,其中参与基础代谢的最多,共 11 个 ESTs,占全部功能已知 ESTs 的 25.6%,单加氧酶、 α -葡萄糖苷酶、氧化还原酶等参与了碳水化合物的代谢。参与胁迫应答的 ESTs 有 6 个,包括对红光和向性运动的应答,有 1 个 ESTs 参与了植物的发育过程,10 个 ESTs 未找到匹配结果。

2.4 基因表达分析

随机选取了 6 个花发育相关基因片段,即编号

为 AY770402、BT051452、FJ347970、BT051115、EF434389 和 AY587270 的 ESTs 进行了时空表达模式分析结果显示,AY770402 为与雄蕊发育相关的基因,BT051452 和 BT051115 为与开花时间相关的基因,FJ347970 为小孢子发育相关的基因,AY587270

表 4 K 库 43 个 ESTs 功能分类及比例

Table 4 Percentage distribution of the 43 ESTs in K tool based on the functional classes

功能分类 Functional class	数量 Number	比例 Percent/%
基础代谢 Primary metabolism	11	25.6
胁迫应答 Stress response	6	14.0
蛋白活性 Protein activity	8	18.6
翻译 Translation	1	2.3
转录 Translation	4	9.3
发育 Development	1	2.3
蛋白结合 Protein binding	3	7.0
其他 Others	2	4.7
未找到 Not found	10	23.3

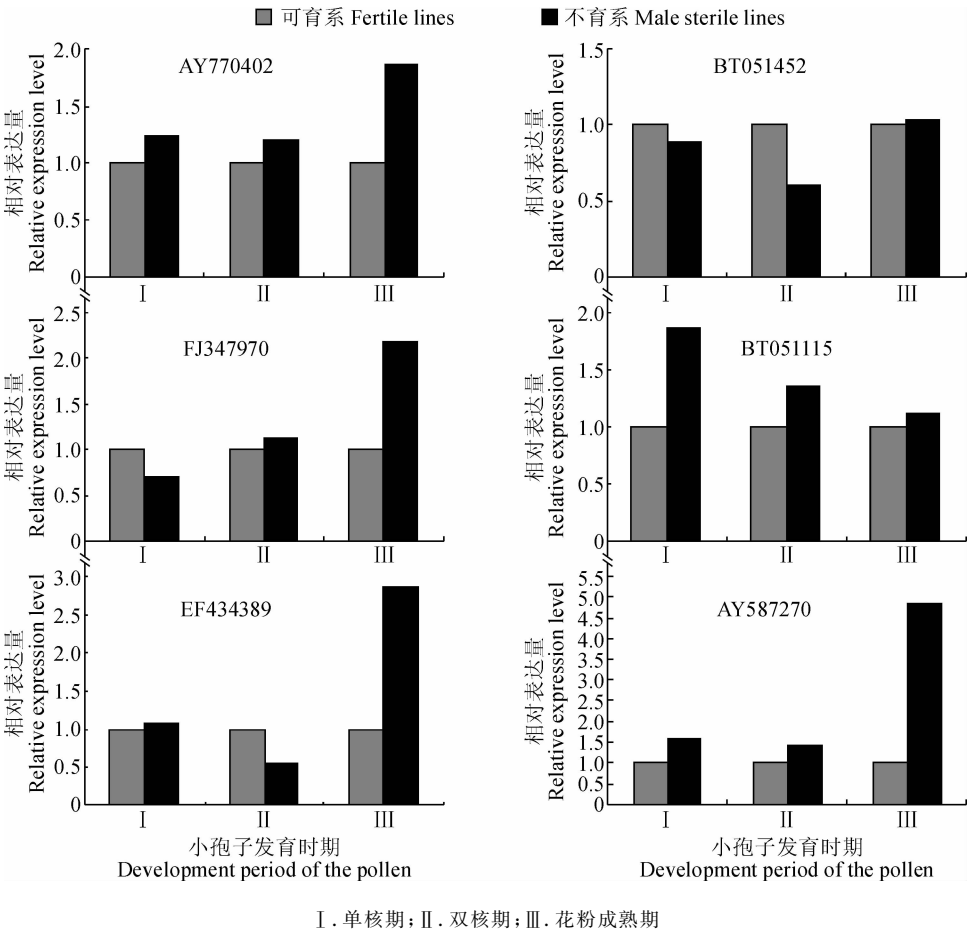


图 1 差异基因在苜蓿雄性不育系和可育系小孢子发育不同时期的相对表达分析
I. Monokaryotic stage; II. Binucleate stage; III. Pollen maturation stage
Fig. 1 Relative expression of differentially expressed genes in different stages of microspore development in alfalfa male sterile line and fertile line

为花粉管发育相关的基因,EF434389 为蔗糖合成相关的基因。qRT-PCR 检测结果(图 1)表明,这些基因在花蕾发育不同时期,雄性不育株与可育株间均存在差异。在花粉败育期(小孢子单核期)BT051452 和 FJ347970 在不育系中的表达量低于可育系,其他 4 个基因在不育系中的表达量高于可育系。在双核期和花粉成熟期,除 BT051452 和 EF434389 外,不育系的表达量均高于可育系。通过基因的差异表达,推测这 6 个基因都可能与育性相关。

3 讨论

牧草雄性不育性的研究与作物相比一直处于基础研究阶段^[10-13]。作物利用雄性不育系进行“三系”配套生产杂交种,已取得了重要进展^[14-18]。苜蓿作为豆科“牧草之王”,是牧草生产的当家草种。缺乏优良品种是苜蓿育种面临的主要问题。雄性不育育种是解决该问题的主要途径之一。1978 年,苜蓿雄性不育系 MS-4 的发现对于杂交育种具有里程碑的意义,但由于其雌蕊育性差,一直未在生产上利用^[19-23]。如何通过基因工程获得优良不育系是一直以来需要解决的问题。不育系 MS-4 的差异基因是什么,基因如何表达是基因工程研究的基础。本研究利用 SSH 技术分离苜蓿雄性育性相关 ESTs,构建苜蓿雄性育性恢复相关 cDNA 文库,并对推断出的相关基因进行表达分析,为进一步对苜蓿雄性育性相关基因的深入研究奠定基础。试验材料中不育系与可育系为近等基因系,这在理论上保证了获得的差异表达基因与育性恢复基因位点的相关性。

抑制性消减杂交技术(SSH)具有假阳性率低、筛选效率高、操作简单等优点,特别适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能。该技术的应用最初主要集中在肿瘤基因的克隆方面,在植物研究领域较少。进入 21 世纪以来,许多学者开始利

用该技术进行植物雄性不育性的研究,但大多集中在作物上^[-24-25],在牧草雄性不育性上的研究还未见报道。本研究利用 SSH 技术进行苜蓿雄性不育系 MS-4 与可育系差异基因的探索,该结果将对不育系 MS-4 的基因工程研究及其他牧草的差异基因发掘具有重要指导意义。

植物雄性不育是花粉发育过程中多基因表达调控的结果。据研究,花药发育过程中约有 20 000 个基因参与表达,而其中 20% 的基因属于花药特异表达基因。综合整个消减 cDNA 文库分析,可以看出苜蓿雄性不育恢复基因诱导表达的相关基因涉及基础代谢、胁迫应答、蛋白活性、转运、翻译、花发育和信号转导等。在获得的 ESTs 中,与 MADS-box 基因家族有关的基因有 3 个。MADS-box 基因是真核生物中一类重要的转录调控因子,在生长发育调控和信号传导中发挥着重要作用。MADS-box 基因的名称来自酿酒酵母转录因子 MCMI、拟南芥花同源异型基因 AGAMOUS、金鱼草花同源异型基因 DEFICIENS 和人血清应答因子 SRF 4 种蛋白的首字母,这 4 种蛋白质都有一个由 56~58 个氨基酸组成的高度保守区域称为 MADS-box 结构域,具有这一结构域的基因都是 MADS-box 基因,属于 MADS-box 基因家族。在植物中参与花器官的发育和开花时间的调节。许多研究表明,多数与花发育相关的基因属于 MADS-box 基因家族^[26-31]。在苜蓿研究中,MADS-box 基因家族参与了花发育^[32-33],本研究发现,雄蕊发育相关基因 AY770402 在苜蓿雄性不育系 MS-4 小孢子发育关键时期过量表达,该基因可能是雄性器官发育的关键基因,开花时间与小孢子发育相关基因 BT051452 和 FJ347970 在不育系中的表达量低于可育系。这些与雄蕊发育相关基因的差异表达,表明 AY770402、BT051452 和 FJ347970 可能与苜蓿雄性不育系小孢子发育密切相关,具体功能还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈林,吴迪,白文明,等. F 型小麦雄性不育系测恢研究及杂种优势分析[J]. 麦类作物学报, 2016, 36(4): 420-425.
CHEN L, WU D, BAI W M, *et al.* Fertility restoration of F-type wheat male sterile line and heterosis of its hybrids[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2016, 36(4): 420-425.
[2] 周瑞阳,张新,张加强,等. 红麻细胞质雄性不育系的选育及杂种优势利用取得突破[J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 314.

ZHOU R Y, ZHANG X, ZHANG J Q, *et al.* A breakthrough in kenaf cytoplasmic male sterile lines breeding and heterosis utilization[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(1): 314.
[3] 李会霞,王玉文,王高鸿,等. 谷子雄性不育系杂种优势利用研究[J]. 甘肃农业科技, 2002, 12: 7-9.
LI H X, WANG Y W, WANG G H, *et al.* Utilization on heterotic dominance of male-sterile line of millet[J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2002, 12: 7-9.

- [4] 李承斌,范永怀,冯 辉. 黄心春结球白菜核基因雄性不育系的创制与利用[J]. 沈阳农业大学学报, 2015, **46**(2):150-154.
LI C Y, FAN Y H, FENG H. Breeding and utilization of the genetic male sterile line in yellow heart spring Chinese cabbage [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2015, **46**(2):150-154.
- [5] 牛金生,韩光明,蓝家祥,等. 棉花光温敏核不育系 396A 育性特征及杂种优势分析[J]. 棉花科学, 2016, **38**(6):7-12.
NIU J S, HAN G M, LAN J X, *et al.* Fertility characteristics and heterosis of cotton photo-thermo sensitive genic male sterile (P/TGMS) lines 396A [J]. *Cotton Sciences*, 2016, **38**(6):7-12.
- [6] 陈乐天,刘耀光. 水稻野败型细胞质雄性不育的发现利用与分子机理[J]. 科学通报, 2016, **61**(35):3 804-3 812.
CHEN L T, LIU Y G. Discovery, utilization and molecular mechanisms of CMS-WA in rice [J]. *Chin Sci Bull*, 2016, **61**(35):3 804-3 812.
- [7] 焦仁军,朱柏羊,钟 萍,等. 水稻雄性不育突变体 D63 的育性基因遗传分析与精细定位[J]. 植物遗传资源学报, 2016, **17**(3):529-535.
JIAO R J, ZHU B Y, ZHONG P, *et al.* Genetic analysis and molecular mapping of the rice male sterile mutant D63 [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, **17**(3):529-535.
- [8] 张保雷,张卫东,高庆荣,等. 温光敏雄性不育小麦 BNS 育性的遗传效应分析[J]. 中国农业科学, 2013, **46**(8):1 533-1 542.
ZHANG B L, ZHANG W D, GAO Q R, *et al.* Genetic analysis on male sterility of the rmo-photo-sensitive male sterile line BNS in wheat [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, **46**(8):1 533-1 542.
- [9] 张 蒙,刘 记,魏恒玲,等. 陆地棉光敏雄性不育基因 *ys-1* 的遗传分析与初步定位[J]. 棉花学报, 2017, **29**(1):9-16.
ZHANG M, LIU J, WEI H L, *et al.* Genetic analysis and preliminary mapping of the photoperiod-sensitive male sterility gene *ys-1* in upland cotton [J]. *Cotton Science*, 2017, **29**(1):9-16.
- [10] 刘子涵,蒙立颖,姚 盟,等. 牡山羊草细胞质雄性不育小麦败育的生物学特性和细胞学研究[J]. 中国农业大学学报, 2016, **21**(5):1-9.
LIU Z H, MENG L Y, YAO M, *et al.* Biological characteristics and cytological studies on abortion of *Aegilops juvenalis* cytoplasmic male sterile line [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2016, **21**(5):1-9.
- [11] 吴佳海,刘正书,牟 琼,等. 高羊茅雄性不育系的发现及初步鉴定[J]. 种子, 2001, (5):78+80.
WU J H, LIU Z S, MU Q. *et al.* Discovery and preliminary identification of male sterility in tall fescue [J]. *Seed*, 2001, (5):78+80.
- [12] 贾 瑞,于洪柱,徐 博,等. 苜蓿不同品种与雄性不育系 MS-GN 杂交 F₁ 代草产量和品质分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, **43**(5):12-20.
JIA R, YU H Z, XU B, *et al.* Yield and quality of hybrid F₁ grass of different alfalfa varieties with male sterile line MS-GN [J]. *Journal of Northwest A&F University* (Natural Science Edition), 2015, **43**(5):12-20.
- [13] G. L. Piggot, 何咏松. 狼尾草雄性不育的遗传学基础[J]. 国外畜牧学. 草原与牧草, 1987, (5):34.
G. L. Piggot, HE Y S. The genetic basis of male sterility of *Pennisetum* [J]. *Foreign Animal Husbandry. Grassland and Pasture*, 1987, (5):34.
- [14] 贾利萍,孙立春. 中粳三系杂交稻新品种 II 优 08 特征特性及配套栽培技术[J]. 安徽农学通报, 2012, **18**(2):30+91.
JIA L P, SUN Q C. Characteristics and cultivation techniques of medium maturing indica CMS line new variety II You08 in rice [J]. *Auhui Agricultural Science Bulletin*, 2012, **18**(2):30+91.
- [15] 朱春生,周德桂,吴佑睦,等. 湘远 A 杂交棉花三系配套研究及应用[J]. 湖南农业科学, 2013, (19):1-3.
ZHU C S, ZHOU D G, WU J T, *et al.* Three-line combination of the hybrid cotton Xiangyuan A and its utilization [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2013, (19):1-3.
- [16] 寇思荣,何海军,周玉乾,等. 三系配套玉米新杂交种陇单 339 选育[J]. 中国种业, 2015, (7):48-49.
KOU S R, HE H J, ZHOU Y Q, *et al.* Breeding of CMS new maize hybrid Longdan 339 [J]. *China Seed Industry*, 2015, (7):48-49.
- [17] 罗爱玉,张红宾,张建东,等. 三系配套辣椒新品种“航椒红丰”[J]. 农业科学与技术, 2016, **17**(3):516-517.
LUO A Y, ZHANG H B, ZHANG J D, *et al.* A new hot pepper cultivar ‘Hangjiao Hongfeng’ [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2016, **17**(3):516-517.
- [18] 尹立荣,管长志,陈 磊. 春播胡萝卜新品种‘天红 5 号’的选育[J]. 中国蔬菜, 2009, (14):74-76.
YIN L R, GUAN C Z, CHEN L. A new carrot F₁ hybrid cultivated in spring-‘Tianhong No. 5’ [J]. *China Vegetables*, 2009, (14):74-76.
- [19] 陈海玲,吴立伟,石凤翎,等. 苜蓿雄性不育系杂交组合光合特性及杂种优势分析[J]. 种子, 2013, **32**(3):64-69.
CHEN H L, WU L W, SHI F L, *et al.* Analysis of photosynthetic characteristics and heterosis in cross combination of sterile lines MS-4 of alfalfa [J]. *Seed*, 2013, **32**(3):64-69.
- [20] 蔡丽艳,石凤翎,陈海玲,等. 不同苜蓿雄性不育系杂交组合牧草产量杂种优势分析[J]. 中国草地学报, 2013, **35**(2):24-30.
CAI L Y, SHI F L, CHEN H L, *et al.* The heterosis of forage yield of cross combinations with alfalfa male sterile lines [J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2013, **35**(2):24-30.
- [21] 石凤翎,李 红,周丽梅,等. 影响苜蓿雄性不育系杂交制种

产量因素的分析[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2000, **21**(1): 85-90.

SHI F L, LI H, ZHOU L M, *et al.* Analysis on factors affecting seed production of male-sterile lines in alfalfa[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University* (Natural Science), 2000, **21**(1): 85-90.

[22] 高翠萍, 石凤翎, 蔡丽艳, 等. 苜蓿雄性不育系 MS-4 回交早代雌蕊育性分析[J]. 种子, 2008, **27**(1): 26-29+33.

GAO C P, SHI F L, CAI L Y, *et al.* Analysis of pistil fertility in early generation of backcross of male sterile lines MS-4 of alfalfa[J]. *Seed*, 2008, **27**(1): 26-29+33.

[23] 伊凤艳, 石凤翎, 龙瑞才, 等. 苜蓿雄性不育植株与可育植株现蕾初期花蕾蛋白质组比较[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(10): 1 964-1 971.

YI F Y, SHI F L, LONG R C, *et al.* Comparative proteomic analysis of bud proteins of alfalfa male sterile and fertile plants at bud emergence stage[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, **33**(10): 1 964-1 971.

[24] 肖辉海, 贺安娜, 刘俊飞. 温敏核不育水稻穗颈节间的 SSH 特异表达[J]. 西北植物学报, 2006, **26**(11): 2 257-2 264.

XIAO H H, HE A N, LIU J F. SSH specific expression of the internodes beneath the spikes of thermo-sensitive genic male sterility rice [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, **26**(11): 2 257-2 264.

[25] 宋国琦, 胡银岗, 林凡云, 等. YS 型小麦温敏雄性不育系 A3017 育性相关基因的 SSH 分析[J]. 西北植物学报, 2006, **26**(7): 1 301-1 308.

SONG G Q, HU Y G, LIN F Y, *et al.* SSH analysis of fertility-related genes of YS-type thermo-sensitive male sterile line A3017[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, **26**(7): 1 301-1 308.

[26] 莫正海, 张计育, 宣继萍, 等. 植物花发育调控基因的研究与应用[J]. 北方园艺, 2013, (8): 189-193.

MO Z H, ZHANG J Y, XUAN J P, *et al.* Study and application on the flowering regulating genes in plants[J]. *Northern Horticulture*, 2013, (8): 189-193.

[27] 朱友银, 邵 娟, 王 月, 等. 樱桃 MADS-box 转录因子的生物信息学及其表达分析[J]. 植物生理学报, 2015, **51**(3): 354-362.

ZHU Y Y, SHAO X, WANG Y, *et al.* Bioinformatics analysis of MADS-box genes and their expression in cherry[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, **51**(3): 354-362.

[28] 蔡元保, 杨祥燕, 孙光明, 等. 菠萝花发育相关基因 *AcMADS1* 的克隆与组织表达特性分析[J]. 植物学报, 2014, **49**(6): 692-703.

CAI Y B, YANG X Y, SUN G M, *et al.* Cloning of flowering-related gene *AcMADS1* and characterization of expression in tissues of pineapple (*Ananas comosus*) [J]. *Bulletin of Botany*, 2014, **49**(6): 692-703.

[29] 赵夏云, 鲜登宇, 宋 明, 等. MIKC 型 MADS-box 蛋白对开花调控作用研究进展[J]. 生物技术通报, 2014, (7): 8-15.

ZHAO X Y, XIAN D Y, SONG M, *et al.* Research progress of MIKC-type MADS-box protein regulation on flowering [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, (7): 8-15.

[30] 甘德芳, 吴 娇, 庄 丹, 等. 黄瓜 AP1-FUL 类 MADS-box 基因的克隆及表达分析[J]. 核农学报, 2014, **28**(9): 1 585-1 590.

GAN D F, WU J, ZHUANG D, *et al.* Cloning and expression analysis of AP1-FUL type MADS-box gene in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, **28**(9): 1 585-1 590.

[31] 赵传慧, 周厚君, 童再康, 等. 光皮桦成花相关 MADS-box 基因 *BIMADS1* 的克隆与表达[J]. 浙江农林大学学报, 2015, **32**(2): 221-228.

ZHAO C H, ZHOU H J, TONG Z K, *et al.* Cloning and expression analysis of a floral related MADS-box gene *BIMADS1* from *Betula luminifera* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2015, **32**(2): 221-228.

[32] 张 军, 宋丽莉, 郭东林, 等. MADS-box 基因家族在蒺藜苜蓿的全基因组分析[J]. 草业学报, 2014, **23**(6): 233-241.

ZHANG J, SONG L L, GUO D L, *et al.* Genome-wide identification and investigation of the MADS-box gene family in *Medicago truncatula* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, **23**(6): 233-241.

[33] 丁 旺, 杨青川, 康俊梅, 等. 紫花苜蓿 MADS-box 基因 *NMH7* 的亚细胞定位与表达分析[J]. 中国草地学报, 2011, **33**(5): 15-20.

DING W, YANG Q C, KANG J M, *et al.* Subcellular localization and expression of MADS-box gene *NMH7* in alfalfa [J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2011, **33**(5): 15-20.

(编辑: 宋亚珍)