

# 高通量转录组测序技术在植物雄性不育研究中的应用

刘永明, 张玲, 邱涛, 赵超凡, 曹墨菊

四川农业大学玉米研究所, 成都 611130

**摘要:** 植物雄性不育是指植物雄蕊发育受阻不能产生正常有功能花粉的现象。植物雄性不育不仅是生殖生理研究的宝贵材料, 也是植物杂种优势利用的重要工具。由于高通量转录组测序技术几乎可以检测细胞内所有 mRNA 及非编码 RNA 的信息, 已被广泛应用于生命科学研究的各项领域。在植物雄性不育相关研究中, 高通量转录组测序技术在不同物种、不同败育类型中的应用已有报道, 这为研究者在转录组水平综合了解植物雄性不育的分子机制及代谢网络提供了帮助。本文从测序文库构建策略、差异表达基因、非编码 RNA 的功能特征等方面综述了高通量转录组测序在植物雄性不育机理方面的研究进展, 并探讨了转录组测序技术在花粉败育机制解析及育性相关基因定位中的应用价值, 以期对植物雄性不育的相关研究提供参考。

**关键词:** 植物雄性不育; 转录组; 转录组测序; 非编码 RNA

## Research progress on mechanisms of male sterility in plants based on high-throughput RNA sequencing

Yongming Liu, Ling Zhang, Tao Qiu, Zhuofan Zhao, Moju Cao

Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

**Abstract:** Male sterility is defined as failing to produce functional pollen during stamen development in plants, and it plays a crucial role in plant reproductive research and hybrid seed production in utilization of crop heterosis. High throughput RNA sequencing (RNA-seq) has been used widely in the study of different fields of life science, as it readily detects all the mRNA and non-coding RNA in cells. Recently, RNA-seq has been reported to be applied in different species and kinds of pollen abortion types in plants, which has contributed to the understanding of the molecular mechanism and metabolic networks of male sterility at the transcription level. In this review, we summarize research progress on the mechanisms of male sterility in plants, focusing on RNA-seq analysis encompassing strategies of RNA library construction, differentially expressed genes and functional characteristics of noncoding RNAs involved in stamen abortion. Furthermore, we also discuss application of transcriptome sequencing technology to elucidate pollen abortion mechanisms and map fertility-related genes. We hope to provide references to the study of male sterility in plants.

**Keywords:** plant male sterility; transcriptome; RNA sequencing; noncoding RNA

收稿日期: 2016-01-18; 修回日期: 2016-04-13

基金项目: 四川省科技厅支撑计划项目(编号: 2015NZ0001)资助[Supported by the Science and Technology Department of Sichuan Province (No. 2015NZ0001)]

作者简介: 刘永明, 博士研究生, 专业方向: 玉米生物技术育种。E-mail: liuluckforever@163.com

通讯作者: 曹墨菊, 教授, 博士生导师, 研究方向: 玉米雄性不育。E-mail: caomj@sicau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-031

网络出版时间: 2016/4/20 13:52:56

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160420.1352.004.html>

转录组是指特定细胞在某一功能状态下转录出来的所有 RNA 的总和, 包括 mRNA 和非编码 RNA(Non-coding RNA)。与差异显示技术、基因芯片、数字基因表达谱等常规方法相比, 转录组测序(RNA-sequencing, RNA-seq)具有灵敏度高、信号数字化、检测范围广等优点, 已被广泛应用于生物体的多种功能研究<sup>[1,2]</sup>。通过转录组分析, 不仅可以获得研究材料在某一状态下全部已知基因的表达丰度、剪接方式等信息, 还可以在无参考基因组物种中进行基因及新转录本的挖掘<sup>[3,4]</sup>。植物雄性不育是指植株不能产生有功能花粉的现象, 它不仅可作为杂种优势利用的重要工具<sup>[5]</sup>, 同时也是研究植物生殖发育功能网络的理想材料<sup>[6,7]</sup>。研究表明, 植物雄性不育是一个极其复杂的过程, 具有败育形式多样、败育程度各异特征。植物雄蕊败育主要由细胞核或细胞质中参与花粉发育的相关基因功能异常引起, 而毒性蛋白、不足的能量供应、异常的细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)等多方面因素都可能导致植株育性不正常<sup>[8]</sup>。鉴于植物雄性不育的复杂性, 采用常规手段从个别基因角度去解析其发生机理具有很大的局限性。随着高通量转录组测序技术的发展与成熟, 目前在水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)等 20 多个物种中, 包括细胞核雄性不育(Genic male sterility, GMS)<sup>[9,10]</sup>、细胞质雄性不育(Cytoplasmic male sterility, CMS)<sup>[11,12]</sup>、化学诱导雄性不育(Induced male sterility)<sup>[13]</sup>、光敏雄性不育(Photoperiod sensitive male sterility, PGMS)<sup>[14]</sup>和温敏雄性不育(Thermosensitive male sterility, TGMS)<sup>[15]</sup>等多种败育类型, 已有采用高通量测序技术从转录水平分析雄蕊败育发生特征的研究报道(表 1), 这对于植物生殖发育及雄蕊败育机理的深入研究具有重要意义, 同时也为相关研究提供了丰富的数据信息。但目前尚没有关于不同物种、不同败育方式在转录组水平上研究结果的综合报道。本文从测序文库构建策略出发主要分析了差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)及非编码 RNA 功能特征, 并探讨了转录组测序在不育机制解析及相关基因定位中的应用前景, 以期转录组测序技术在植物雄性不育研究中的进一步利用以及植物生殖生理机理的

深入解析提供参考。

## 1 转录组测序文库的构建

### 1.1 测序组织与时期选择

选取遗传背景相似或相近, 但在目标性状上存在较大差异的材料, 如近等基因系、突变体与野生型、不育系与保持系等, 进行比较分析是现行转录组研究的主要策略。植物雄性不育通常发生在小孢子发育过程的特定时期, 而不同组织或不同发育时期的基因表达具有较强的时空特异性, 因此选择恰当的组织器官进行转录组测序对于保障研究结果的准确性和可靠性就显得至关重要。材料的选择应主要考虑测序所用组织器官与其发育时期两个方面。在测序组织器官的选取上, 首选花粉或花药, 如棉花、小麦、玉米等相关研究(表 1), 因为这些组织器官是败育发生的主要体现者, 获得的测序数据也便于进一步分析。同时, 在对番茄(*Solanum lycopersicum*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、油菜(*Brassica napus*)等植物的研究中也选用减数分裂时期的花芽进行测序分析, 主要是由于这些材料的雄性生殖器官较小, 不便于分离和收集花药或花粉进行测序分析。在时期的选择上, 多数研究倾向于选择研究材料发生败育的关键时期。如 Yang 等<sup>[16]</sup>对同时选取了 JA 型棉花细胞质败育发生的两个关键时期即造孢细胞期和小孢子母细胞期进行分析; 而 Jeong 等<sup>[9]</sup>研究番茄细胞核雄性不育转录组时, 不但选取了败育发生的四分体时期外, 还比较了败育发生后的绒毡层细胞液泡化时期及雄花成熟阶段的转录组。除此之外, 部分研究者同时选取多个时期进行测序, 以便于分析在小孢子一定发育时期内相关基因的动态变化。例如, Zheng 等<sup>[17]</sup>对细胞质雄性不育杂交后代的可育与不育甜橙(*Citrus sinensis*)进行转录组测序分析时, 同时选取了其小孢子发生的 5 个时期进行混样测序。由于难以准确判断小孢子发育时期, Li 等<sup>[12]</sup>研究大豆(*Glycine max*)细胞核雄性不育时选取了处于败育发生时期的大小各异的花芽进行测序。

通常植物雄蕊发育的形态特征与小孢子发育阶段具有一定的相关性, 因此将花序直径或花药长度等作为标准选取发育时期合适的组织或器官进行测

表 1 植物中雄性不育转录组测序  
Table 1 RNA-seq in plants related to male sterility

物种	不育类型	测序组织/时期	转录组	参考文献
番茄( <i>Solanum lycopersicum</i> )	细胞核雄性不育	花芽/四分体时期，液泡化时期，花粉成熟期	mRNA	[9]
	光敏雄性不育	花芽/减数分裂前，四分体时期，减数分裂后	miRNA	[14]
辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	细胞核雄性不育	花芽/花芽发育时期	mRNA	[10]
	细胞质雄性不育	花芽/不详	mRNA	[25]
油菜( <i>Brassica napus</i> )	细胞质雄性不育	花芽/生殖生长时期(花芽长度 0~1 mm)	mRNA	[11]
	细胞质雄性不育	花芽/生殖生长时期(花芽直径小于 2 mm)	mRNA	[26]
	细胞核雄性不育	花芽/花芽直径小于等于 4 mm	mRNA	[27]
大豆( <i>Glycine max</i> )	细胞质雄性不育	花芽/主要为双核早期	mRNA	[12]
	细胞质雄性不育	花芽/主要为双核早期	miRNA	[28]
小麦( <i>Triticum aestivum</i> )	化学诱导雄性不育	花药/单核期	mRNA	[13]
	温敏雄性不育	小穗/药隔形成早期(雄蕊长度约 1.2 mm)，药隔形成期(雄蕊长度 1.5 mm)，小孢子母细胞时期(雄蕊长度 2.2 mm)，减数分裂时期(雄蕊长度 3.0 mm)	miRNA/TasiRNA	[15]
棉花( <i>Gossypium hirsutum</i> )	细胞质雄性不育	花芽/造孢细胞时期(花芽直径 1.5~2.2 mm)，小孢子时期(花芽直径 2.2~2.6 mm)	mRNA	[16]
	细胞核雄性不育	花药/四分体时期(花芽长度 6~7 mm)，单核期(花芽长度 7~8 mm)，成熟花粉(花芽长度大于 24 mm)	mRNA	[18]
	细胞核雄性不育	花药/减数分裂时期(花芽长度 3.5~5.0 mm)	mRNA	[19]
	细胞核雄性不育	花药/减数分裂时期，四分体时期，单核期	miRNA	[23]
甜橙( <i>Citrus sinensis</i> )	细胞质雄性不育	花芽/花萼原基时期，花瓣原基时期，雄蕊原基时期，成熟花时期	mRNA	[17]
玉米( <i>Zea mays</i> )	细胞核雄性不育	花药/生殖生长时期	phasiRNA	[21]
	细胞质雄性不育	花粉/小孢子时期	miRNA	[29]
水稻( <i>Oryza sativa</i> )	细胞质雄性不育	花药/单核期	miRNA	[24]
椴柑( <i>Citrus reticulata</i> )	雄性不育	花芽/现蕾期(花芽长度 2.5~3.5 mm)，中蕾期(花芽长度 4.5~5.5 mm)，花药/盛花期前(花芽长度 6.5~7.5 mm)，盛花期(散粉前)	miRNA	[30]
萝卜( <i>Raphanus sativus</i> )	细胞质雄性不育	花芽/四分体时期(花芽长度约 1.5 mm)	mRNA	[31]
拟南芥( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	细胞核雄性不育	花药/花粉败育时期	mRNA	[32]
芥菜( <i>Brassica juncea</i> )	细胞质雄性不育	花芽/不详	mRNA	[33]
	细胞质雄性不育	花芽/生殖生长时期	miRNA	[34]
空心莲子草( <i>Alternanthera philoxeroides</i> )	细胞核雄性不育	雄花/生殖生长时期	mRNA	[35]
红麻( <i>Hibiscus cannabinus</i> )	细胞质雄性不育	花药/双核期	mRNA	[36]
西瓜( <i>Citrullu slanatus</i> )	细胞核雄性不育	花芽/生殖生长时期(花芽长度 3~4 mm、7~8 mm)，成熟花时期	mRNA	[37]
不结球白菜( <i>Brassica campestris</i> )	细胞核雄性不育	花芽/开花期	miRNA	[38]
油菜胞质大白菜( <i>Brassica rapa</i> )	细胞质雄性不育	花芽/花药产生至花粉败育时期(花芽长度小于 6 mm)	mRNA/miRNA	[39]
大蒜( <i>Allium sativum</i> )	细胞质雄性不育	花芽/四分体时期(绿色被片长度 2.5~3 mm)，小孢子释放时期(绿色被片长度 3~4 mm)，小孢子成熟时期(紫色被片长度 3~4 mm)	mRNA	[40]

序分析, 将更为科学合理(表 1)。Wu 等<sup>[18]</sup>利用显微观察发现棉花花芽长度与小孢子发育时期存在关联, 当花芽长度为 6~7 mm、7~8 mm 和大于 24 mm 时, 小孢子分别处于四分体、单核期和成熟花粉时期, 因此他们选取这 3 个长度范围的花芽进行测序分析; 而 Yang 等<sup>[16]</sup>研究棉花 JA 型细胞质不育则是根据花芽直径大小判定小孢子发育的时期; 对棉花核不育材料 21A 研究发现花芽长度处于 3.5~5 mm 时小孢子处于减数分裂时期, Zhang 等<sup>[19]</sup>依据此发育特征选取了小孢子减数分裂中的花药进行转录组测序。同时, 在研究小 RNA 与雄性不育发生的关系时, Zhang 等<sup>[20]</sup>发现玉米小孢子发育时期与花药长度之间存在显著相关, Zhai 等<sup>[21]</sup>进一步发现了 phasiRNA 的表达具有时空特异性。侯磊等<sup>[22]</sup>在棉花中也发现小孢子发育与花芽长度之间的关系, Wei 等<sup>[23]</sup>基于这一研究结果直接选取小孢子不同发育时期的花芽进行 miRNA 功能分析。此外, Yan 等<sup>[24]</sup>在研究调控水稻细胞质雄性不育相关 miRNA 时, 则根据小孢子发育单核期在小穗长度及旗叶与倒数第二叶叶耳距离等特征判定小孢子的发育时期。

## 1.2 RNA 测序文库构建

对于测序文库构建, 不同研究者采用的混样方式有所区别。Chen 等<sup>[10]</sup>及 Liu 等<sup>[25]</sup>先提取各材料组织的 RNA, 再选取不同时期或不同单株等量 RNA

进行混合, 而 Zhu 等<sup>[35]</sup>及 An 等<sup>[11]</sup>则是先将不同单株的组织进行等量混合并提取 RNA, 这两种混样方式得到的数据信息是否存在差别以及各有哪些优缺点, 目前尚没有相关的比较分析。笔者认为, 如果先提取 RNA 再进行等量混合, 优点在于各个平行进行测序的 RNA“量”是基本一致的, 但各个材料 RNA“质”或多或少存在不可避免的差异。如果采取先将等量材料进行混合, 共同提取 RNA, 优点在于能够应用于细微组织且反映了重量相同的材料中各基因转录水平, 各个平行提取的 RNA“质”是一致的, 但由于不同组织或发育时期 RNA 可能会存在丰度差异, 进而会造成最终进行测序的 RNA 并不是各个材料均一混合品, 在“量”上存在差异。总之, 两种方法各有所长也各有缺陷, 如何平衡“质”与“量”的关系, 需要研究者结合实际情况进行选择。

## 2 雄性不育转录组差异表达基因

### 2.1 差异表达基因

通过转录组测序分析往往能够在遗传背景相似但在育性上存在差别材料间检测到大量的差异表达基因(表 2), 分析这些基因表达量的变化特征为挖掘基因功能及解析植物雄性不育提供了重要途径。如 Mei 等<sup>[31]</sup>在研究萝卜(*Raphanus sativus*)细胞质雄性不育转录组时, 他们选取相同胞质两个不同核背

表 2 植物雄性不育差异表达基因 GO 分析

Table 2 GO analysis of differentially expressed genes in plant male sterility

物种	差异表达基因数	不育与可育材料间差异表达基因富集的分子功能与生物学过程	参考文献
番茄	246	转录因子, 细胞修饰, 细胞凋亡, 转运, 花粉壁或花粉外壳蛋白, 脂质代谢, 减数分裂	[9]
辣椒	668	氧化还原酶活性, 金属离子结合, 转移酶活性, 代谢, 蛋白修饰, 转运	[10]
油菜	1148	氧化还原酶活性, 水解酶活性, 胞内芳香族化合物代谢, 次生代谢	[11]
大豆	365	酶活性调节, 脂质结合, 糖类结合, 胚发育, 细胞组分合成, 糖类代谢	[12]
小麦	1088	结合, 催化活性, 转运活性, 代谢, 胞内代谢, 应激反应	[13]
棉花	1353	光合作用, 类黄酮生物合成, 氧化还原反应, 亚麻酸代谢	[16]
棉花:	1742	裂解酶活性, 氧化还原酶活性, 核小体形成, 脂质定位, 脂肪酸合成, 有机物运输	[19]
辣椒	11387	离子转运活性, 裂解酶活性, 转运活性	[25]
油菜	3199	结合, 催化活性, 转录调节, 转运活性, 代谢过程, 胞内代谢, 应激反应, 生物调控	[27]
萝卜	539	结合, 催化活性, 转运活性, 代谢, 胞内代谢, 应激反应	[31]
拟南芥	1114	转录调节, 转运, 发育	[32]
红麻	4584	胞内大分子代谢, 基因表达, 花粉粒外壁形成, 胞内蛋白代谢, 花粉壁组装, 胞内组装	[36]
大蒜	16271	代谢调控, 花器官发育, 细胞组分形成, 多糖分解代谢, 蛋白聚合作用, 花青素代谢	[40]

景材料 HYBP-A 与 YH-A 进行比较研究, 最终筛选得到在两个核背景下不育系与保持系共有的差异表达基因, 同时发现这些基因与育性紧密联系, 表达水平(上调或下调)在两组材料中是一致的。Shemesh 等<sup>[40]</sup>对细胞质雄性不育大蒜(*Allium sativum*)的转录组与蛋白质组同时进行分析, 发现大部分基因的表达水平的表达与蛋白水平的表达是相对应的。以上研究表明, 基因的表达丰度与其功能息息相关, 研究者可以通过分析基因表达水平的变化预测基因功能的变化。

在实际应用中, 为了获取最为关键的基因, 往往需要将得到的差异表达基因根据错误出现率(False discovery rate, FDR)及差异表达倍数进行筛选, 以排除其他因素对基因表达造成的影响<sup>[41]</sup>。通过转录组分析发现, 基因的表达水平受到核背景、败育方式等多方面的影响。例如, Mei 等<sup>[31]</sup>在萝卜中发现同一细胞质不同核背景材料 HYBP-A 与 YH-A 与其对应的保持系差异表达基因数分别为 3843 和 2041 个, 说明不同核背景也会对不育系与相应保持系之间的差异表达基因数量造成影响。同一物种不同类型的败育材料, 其差异表达基因数量、差异表达的方式等均可能存在较大的差别。如 An 等<sup>[11]</sup>发现 Pol 型细胞质雄性不育油菜的不育株上调表达基因明显多于可育株, 而 Qu 等<sup>[27]</sup>在细胞核雄性不育油菜中发现基因上调表达主要出现在可育材料中。

## 2.2 差异表达基因功能富集通路

转录组分析发现, 雄性不育的发生可能同时伴随着大量基因的表达上调或下调, 对这些基因逐一进行分析不仅工作量巨大, 且不利于了解这些基因总体的功能特征。因此, 利用功能注释数据库对差异表达基因进行富集分析, 就不同物种或同一物种不同败育方式在富集通路上的差异和共同点进行比较分析, 对了解不同物种雄蕊败育的普遍特征和深入解析雄性不育的代谢途径具有重要意义。

基因功能聚类分析主要参考的数据库包括 GO(Gene Ontology Consortium)、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、COG(Cluster of Orthologous Groups of proteins)等, 其中 GO 数据库应用最为广泛。利用 GO 分析雄性不育相关转录组

数据, 发现相关差异表达基因富集在植物生理生化代谢中有多个功能通路(表 2), 这也暗示了植物雄性不育形成机理的复杂性。其中, 花粉壁形成、类黄酮合成等过程与花粉发育密切相关<sup>[42]</sup>, 而光合作用、细胞凋亡、亚麻酸代谢等通路参与了细胞程序性死亡, 细胞程序性死亡与植物雄性不育息息相关<sup>[8]</sup>。同时, 分析发现差异表达基因富集通路在不同败育类型材料中同时表现出“共性”和“个性”的特征。一方面, 差异表达基因功能主要集中在氧化还原、转录调控、物质转运、花粉壁形成、脂类代谢等方面, 这是由于这些过程与植物生殖生长密切相关, 保证了花器官正常发育的能量和物质供应, 而育性的变化必然伴随相关基因表达的改变。另一方面, 由于败育方式各异, 个别材料又表现出特有的差异基因富集的功能通路, 如大豆细胞质雄性不育中, 参与胚发育的基因在所有差异表达基因占有数量最多<sup>[12]</sup>; 大蒜细胞质雄性不育中, 花青素代谢相关基因在差异表达基因中占有一定比例<sup>[40]</sup>。

## 3 雄性不育相关非编码 RNA

非编码 RNA 是细胞内所有不编码蛋白质的 RNA, 主要包括核糖体 RNA(rRNA)、转运 RNA(tRNA)、小 RNA(small RNA)以及长链非编码 RNA(lncRNA)等。非编码 RNA 作用机制解析是转录组研究的重要内容, 越来越多的研究表明非编码 RNA 在植株体内发挥重要的调控功能, 参与了多种生理和代谢途径, 如组织分化及发育<sup>[43,44]</sup>、生物和非生物胁迫等<sup>[45,46]</sup>。除了参与植物生殖生理<sup>[47~50]</sup>, 最新研究表明植物雄性不育的发生也可能直接与非编码 RNA 的作用有关<sup>[51~54]</sup>。因此, 分析非编码 RNA 的功能对于进一步解析植物雄性不育机理尤为重要。

miRNA 是植物体内重要的转录后调控因子, 通过降解目标基因转录本或干扰其翻译在植物雄花正常发育中发挥关键作用<sup>[55]</sup>, 其表达水平可能与植株育性紧密相关<sup>[56]</sup>。相比于动物, 植物 miRNA 与其靶基因序列几乎完全配对, 这就为利用高通量测序鉴定及分析 miRNA 的靶基因提供了捷径。目前通过高通量测序分析发现了大量参与植物生殖发育的 miRNAs, 这些 miRNAs 的作用机制复杂, 伴有时空

特异性。Yan 等<sup>[24]</sup>比较分析了水稻细胞质不育系及保持系中 miRNA 表达谱, 鉴定得到 518 个已知 miRNAs 和 144 个新 miRNAs, 其中存在 24 个差异表达的 miRNAs, 部分 miRNAs 的靶基因与花粉发育相关, 同时还发现部分 miRNAs 存在 RNA 编辑现象, 表明 miRNA 在花药发育及雄性不育发生中存在复杂的作用机制。Omidvar 等<sup>[14]</sup>在研究光敏雄性不育番茄(*Solanum lycopersicum*)时, 发现不育株中有 3 个上调及 9 个下调表达的 miRNAs, 通过对这些 miRNAs 及其靶基因进行联合分析, 证明了 miRNA 的表达具有时空特异性。Wei 等<sup>[23]</sup>在研究棉花核不育发现野生型 miRNA 及 siRNA 数量显著多于不育株, 并且 miRNA 在小孢子形成的减数分裂、四分体及单核期等各个时期表现出特异性。由于 miRNA 调控功能主要是依赖其对靶基因转录本的降解, 因此利用降解组测序分析其下游靶基因是研究 miRNA 功能的关键环节。Tang 等<sup>[15]</sup>通过对小麦温敏雄性不育材料小 RNA 测序得到了 78 个已知的 miRNAs 和部分 tasiRNAs, 进一步利用降解组测序鉴定了 16 个 miRNA 家族的 26 个靶基因以及 tasiRNAs 的 3 个靶基因。Wei 等<sup>[39]</sup>利用大白菜(*Brassica rapa*)细胞质雄性不育系及其保持系共得到 426 个新的 miRNAs, 甚至多于已知的 289 个 miRNAs, 表明高通量转录组测序对于挖掘新的 miRNA 具有重要应用价值。Jiang 等<sup>[38]</sup>利用不结球白菜(*Brassica campestris*)同时从 miRNA 和降解组两个方面分析了 miRNA 参与生殖发育。小 RNA 测序发现, miRNA 靶基因中相当一部分是转录因子<sup>[30,57]</sup>。例如, Yang 等<sup>[34]</sup>利用 miRNA 及降解组测序发现芥菜(*Brassica juncea*)miRNA 靶基因包含 NAC、MYB、TCP 等转录因子家族成员, 在番茄中也发现部分转录因子可以作为 miRNA 的靶基因参与雄性生殖器官的发育<sup>[14]</sup>。此外, Yu 等<sup>[29]</sup>在玉米 S 型细胞质不育材料中发现 miRNA 的靶基因主要参与基因调控。综合已有的研究结果不难发现, miRNA 通过调节转录因子实现对基因表达的调控可能是其发挥作用的重要特征。转录因子的调控作用在雄蕊正常发育中至关重要<sup>[58]</sup>, 如 Dukowic 等<sup>[59]</sup>及 Jiang 等<sup>[60]</sup>在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和玉米中鉴定出 MYB、bHLH、WRKY 等

众多转录因子家族参与减数分裂调控, 部分转录因子功能异常可能会导致植株雄蕊败育<sup>[61]</sup>。由此可见, miRNA 可通过调节转录因子的表达引发一系列生理、生化反应并形成高效有序的信号调控网络, 从而保障植株正常的生长发育。

除了 miRNA, 其他非编码小 RNA 的功能机制在植物雄性不育转录组分析中也有报道。Zhai 等<sup>[21]</sup>利用 5 个玉米细胞核雄性不育材料, 其花药的发生异常的部位不同, 并在花药中发现了具有时空特异性表达的次级小干扰 RNA(Phased small-interfering RNAs, phasi RNAs), 其中 21nt 长度的 phasiRNA 主要产生于减数分裂前并需要正常的表皮层, 而 24nt phasiRNA 主要形成于减数分裂时期且需要正常的绒毡层, 推测 phasiRNA 与植物雄性不育的发生有关。

长链非编码 RNA 与植物生殖发育密切相关。Zhang 等<sup>[62]</sup>利用链特异性 RNA 测序技术(Whole transcriptome strand-specific RNA sequencing, ssRNA-seq), 比较分析了水稻花药、雌蕊、种子、根等组织器官中的长链非编码 RNA, 发现其在表达水平上具有时空特异性, 同时部分长链非编码 RNA 参与植物的生殖发育。进一步分析发现, 部分长链非编码 RNA 通过内源性竞争 RNA 作用(Competing endogenous RNAs, ceRNAs)或调控功能参与植物生殖过程。综合以上结果可以看出, 利用高通量测序不仅有助于人们对植物雄蕊败育机制的认识, 同时各种败育类型的转录组数据对于解析基因在转录水平的功能特征及非编码 RNA 表达的时空特异性具有重要意义。

#### 4 植物雄性不育机制及基因定位研究

利用 cDNA 差异显示<sup>[63,64]</sup>及基因芯片<sup>[65,66]</sup>等技术方法对雄蕊败育机理进行探索的研究已有报道。近年来随着高通量测序技术的迅猛发展, 通过转录组测序技术从 RNA 水平对植物雄性不育机制进行解析的研究报道逐渐增多。例如, Zhou 等<sup>[67]</sup>通过微阵列及转录组测序鉴定得到水稻温敏不育基因 *tms5* 下游靶基因 *Ub<sub>L40</sub>*, *Ub<sub>L40</sub>* 具有泛素化功能并受高温诱导表达。由于 *tms5* 核酸内切酶功能丧失使得 *Ub<sub>L40</sub>* 转录水平在高温下持续升高并破坏胞内泛素的动态平衡, 进而引起不可溶的泛素化蛋白增加, 诱发花

粉母细胞液泡化, 最终导致花粉败育。此外, Zhou 等<sup>[54]</sup>通过小 RNA 测序发现水稻温敏不育基因 *tms12* 可形成一个 21nt 的小 RNA smR5864, 而出现在小 RNA 中的一个单碱基突变(C/G)与植株育性转变具有直接的联系。Jeong 等<sup>[9]</sup>通过转录组测序鉴定了番茄不育基因 *Ms10<sup>35</sup>* 参与调控的 246 个基因, 这部分基因功能主要涉及减数分裂、绒毡层发育、花粉壁形成等过程, 这暗示 *Ms10<sup>35</sup>* 可能在小孢子形成的减数分裂和绒毡层细胞程序性死亡过程中发挥关键的调控功能。Zhu 等<sup>[32]</sup>对拟南芥 *bhlh10/bhlh89/bhlh91* 三突变体及野生型进行转录组比较分析, 发现不育株中下调表达的基因功能主要涉及转录调控、转运及发育等, 这从侧面说明了这 3 个 *bHLH* 基因在这些功能途径中发挥着正向调控功能。与此同时, 研究者结合转录组测序数据发现已报道的小孢子发育相关基因 *MYB103*、*MS1*、*MYB99* 在三突变株中表达量显著降低, 而 *DYT1* 表达量升高, 他们推测这种现象是基因间作用位次决定的, 即 *DYT1* 位于作用网络的上游, 而另外 3 个基因位于作用网络的下游。这表明可以通过高通量转录组测序解析雄蕊发育相关基因间表达丰度及特征, 并探究它们之间的调控关系。

将转录组测序技术应用于基因定位的研究目前已有报道<sup>[68]</sup>, 但关于转录组测序技术应用于不育基因定位的研究报道较少。植物花粉形成需要经过减数分裂、绒毡层发育、花粉壁形成、花药开裂等多个环节<sup>[69]</sup>, 而能量缺陷、活性氧爆发、细胞程序性死亡异常等都会造成植物雄性不育<sup>[8,70]</sup>。笔者分析, 正是由于植物败育方式的多样性及败育机理的复杂性, 使得对控制不育性状表现的基因进行定位及研究变得异常困难。育性恢复基因的克隆对植物细胞质雄性不育在生产上的利用十分关键, 基于图位克隆结合转录组测序可以鉴定染色体上一定区间内的差异表达基因及 SNP, 同时, 这将有助于恢复基因的定位及候选基因的筛选。目前将转录组测序技术应用于育性恢复基因定位的研究报道较多, 例如, 在萝卜<sup>[71]</sup>、洋葱(*Allium cepa*)<sup>[72]</sup>、芥菜<sup>[73]</sup>等作物中已有相关报道。利用转录组测序直接进行基因定位当前仍然存在困难及局限, 因为基因的突变位点可能并不存在于转录组中, 无法通过转录组测序检测

到其变异; 同时, 突变基因在突变体与野生型中表达水平可能并不存在明显差异。虽然利用转录组测序进行基因定位面临许多挑战, 但越来越多的研究选择通过转录组鉴定目标基因的下游基因, 以探究植物雄性不育的形成机制, 这为转录组测序在植物雄性不育研究中的应用开辟了新的方向。

## 5 结语与展望

植物雄性不育作为杂种优势利用的重要工具, 长期以来受到遗传育种工作者的广泛关注, 并取得了长足的进展。当今, 随着技术的进步和研究手段的不断更新, 对植物雄性不育机理的认识也变得更加全面和深刻, 渐渐发现其复杂程度远远超出了预期, 这提示人们单纯从个别基因或通路进行分析或许难以揭示其复杂的机制。应用高通量转录组测序技术可以获得大量在不育与可育材料间差异表达的转录信息, 这些差异表达的基因或非编码 RNA 往往在植物生殖发育中具有重要功能作用, 并有助于人们对植物生殖生理的深入认识。同时, 目前转录组研究对象主要集中于 mRNA 及 miRNA, 研究发现植物在转录水平还有 hc-siRNA、phasRNA、NAT-siRNA 和 circRNA 等其他多种产物, 利用转录组对这些非编码小 RNA 进行分析将有助于进一步揭示植物雄性不育的机制。在植物雄性不育研究中, 当前进行转录组分析选取的小花、花芽、花药、花粉等组织或器官并不仅仅包含生殖细胞, 因而会对最终的分析结果造成一定影响。单细胞测序技术已成功应用在植物研究中<sup>[74]</sup>, 如果能够借助此技术对植物雄性生殖细胞进行直接分析将为转录组测序在植物雄性不育研究中的应用开启一个新的篇章。

## 参考文献(References):

- [1] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57–63. [DOI]
- [2] Qi YX, Liu YB, Rong WH. RNA-Seq and its applications: a new technology for transcriptomics. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(11): 1191–1202.  
祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用. *遗传*, 2011, 33(11): 1191–1202. [DOI]
- [3] Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson

- DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(7): 644–652. [DOI]
- [4] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 511–515. [DOI]
- [5] Perez-Prat E, van Lookeren Campagne MM. Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(5): 199–203. [DOI]
- [6] Gómez JF, Talle B, Wilson ZA. Anther and pollen development: A conserved developmental pathway. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57(11): 876–891. [DOI]
- [7] Guo JX, Liu YG. Molecular control of male reproductive development and pollen fertility in rice. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54(12): 967–978. [DOI]
- [8] Chen LT, Liu YG. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65(1): 579–606. [DOI]
- [9] Jeong HJ, Kang JH, Zhao MA, Kwon JK, Choi HS, Bae JH, Lee HA, Joung YH, Choi D, Kang BC. Tomato *Male sterile 10<sup>35</sup>* is essential for pollen development and meiosis in anthers. *J Exp Bot*, 2014, 65(22): 6693–6709. [DOI]
- [10] Chen CM, Chen GJ, Cao BH, Lei JJ. Transcriptional profiling analysis of genic male sterile-fertile *Capsicum annuum* reveal candidate genes for pollen development and maturation by RNA-Seq technology. *Plant Cell Tiss Organ Cult (PCTOC)*, 2015, 122(2): 465–476. [DOI]
- [11] An H, Yang ZH, Yi B, Wen J, Shen JX, Tu JX, Ma CZ, Fu TD. Comparative transcript profiling of the fertile and sterile flower buds of *pol* CMS in *B. napus*. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 258. [DOI]
- [12] Li JJ, Han SH, Ding XL, He TT, Dai JY, Yang SP, Gai JY. Comparative transcriptome analysis between the cytoplasmic male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *PLoS One*, 2015, 10(5): e126771. [DOI]
- [13] Zhu QD, Song YL, Zhang GS, Ju L, Zhang J, Yu YA, Niu N, Wang JW, Ma SC. *De novo* assembly and transcriptome analysis of wheat with male sterility induced by the chemical hybridizing agent SQ-1. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123556. [DOI]
- [14] Omidvar V, Mohorianu I, Dalmay T, Fellner M. Identification of miRNAs with potential roles in regulation of anther development and male-sterility in *7B-1* male-sterile tomato mutant. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 183. [DOI]
- [15] Tang ZH, Zhang LP, Xu CG, Yuan SH, Zhang FT, Zheng YL, Zhao CP. Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing. *Plant Physiol*, 2012, 159(2): 721–738. [DOI]
- [16] Yang P, Han JF, Huang JL. Transcriptome sequencing and *de novo* analysis of cytoplasmic male sterility and maintenance in JA-CMS cotton. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112320. [DOI]
- [17] Zheng BB, Wu XM, Ge XX, Deng XX, Grosser JW, Guo WW. Comparative transcript profiling of a male sterile cybrid pummelo and its fertile type revealed altered gene expression related to flower development. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43758. [DOI]
- [18] Wu YL, Min L, Wu ZC, Yang L, Zhu LF, Yang XY, Yuan DJ, Guo XP, Zhang XL. Defective pollen wall contributes to male sterility in the male sterile line 1355A of cotton. *Sci Rep*, 2015, 5: 9608. [DOI]
- [19] Zhang YJ, Chen J, Liu JB, Xia MX, Wang W, Shen FF. Transcriptome analysis of early anther development of cotton revealed male sterility genes for major metabolic pathways. *J Plant Growth Regul*, 2015, 34(2): 223–232. [DOI]
- [20] Zhang H, Egger RL, Kelliher T, Morrow D, Fernandes J, Nan GL, Walbot V. Transcriptomes and proteomes define gene expression progression in pre-meiotic maize anthers. *G3 (Bethesda)*, 2014, 4(6): 993–1010. [DOI]
- [21] Zhai JX, Zhang H, Arikat S, Huang K, Nan GL, Walbot V, Meyers BC. Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phase RNAs in maize anthers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(10): 3146–3151. [DOI]
- [22] Hou L, Xiao YH, Li XB, Wnag WF, Luo XY, Pei Y. The cDNA-AFLP differential display in developing anthers between cotton male sterile and fertile line of “Dong A”. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(4): 359–363. 侯磊, 肖月华, 李先碧, 王文锋, 罗小英, 裴炎. 棉花洞 A 雄性不育系花药发育的 mRNA 差别显示. 遗传学报, 2002, 29(4): 359–363. [DOI]
- [23] Wei MM, Wei HL, Wu M, Song MZ, Zhang JF, Yu JW, Fan SL, Yu SX. Comparative expression profiling of miRNA during anther development in genetic male sterile and wild type cotton. *BMC Plant Biol*, 2013, 13(1): 66.

- [DOI]
- [24] Yan JJ, Zhang HY, Zheng YZ, Ding Y. Comparative expression profiling of miRNAs between the cytoplasmic male sterile line MeixiangA and its maintainer line MeixiangB during rice anther development. *Planta*, 2015, 241(1): 109–123. [DOI]
- [25] Liu C, Ma N, Wang PY, Fu N, Shen HL. Transcriptome sequencing and *de novo* analysis of a cytoplasmic male sterile line and its near-isogenic restorer line in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *PLoS One*, 2013, 8(6): e65209. [DOI]
- [26] Yan XH, Dong CH, Yu JY, Liu WH, Jiang CH, Liu J, Hu Q, Fang XP, Wei WH. Transcriptome profile analysis of young floral buds of fertile and sterile plants from the self-pollinated offspring of the hybrid between novel restorer line NR1 and *Nsa* CMS line in *Brassica napus*. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 26. [DOI]
- [27] Qu CM, Fu FY, Liu M, Zhao HY, Liu C, Li JN, Tang ZL, Xu XF, Qiu X, Wang R, Lu K. Comparative transcriptome analysis of recessive male sterility (RGMS) in sterile and fertile *Brassica napus* lines. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144118. [DOI]
- [28] Ding XL, Li JJ, Zhang H, He TT, Han SH, Li YW, Yang SP, Gai JY. 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. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 461. [DOI]
- [29] Yu JH, Zhao YX, Qin YT, Yue B, Zheng YL, Xiao HL. Discovery of microRNAs associated with the S type cytoplasmic male sterility in maize. *J Integr Agr*, 2013, 12(2): 229–238. [DOI]
- [30] Fang YN, Qiu WM, Wang Y, Wu XM, Xu Q, Guo WW. Identification of differentially expressed microRNAs from a male sterile Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and its fertile wild type by small RNA and degradome sequencing. *Tree Genet Genomes*, 2014, 10(6): 1567–1581. [DOI]
- [31] Mei SY, Liu TM, Wang ZW. Comparative transcriptome profile of the cytoplasmic male sterile and fertile al buds of radish (*Raphanus sativus* L.). *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1): 42. [DOI]
- [32] Zhu EG, You CJ, Wang SS, Cui J, Niu BX, Wang YX, Qi J, Ma H, Chang F. The DYT1-interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for *Arabidopsis* anther development and transcriptome. *Plant J*, 2015, 83(6): 976–990. [DOI]
- [33] Zhao N, Xu XY, Wamboldt Y, Mackenzie SA, Yang XD, Hu ZY, Yang JH, Zhang MF. MutS HOMOLOG1 silencing mediates *ORF220* substoichiometric shifting and causes male sterility in *Brassica juncea*. *J Exp Bot*, 2016, 67(1): 435–444. [DOI]
- [34] Yang JH, Liu XY, Xu BC, Zhao N, Yang XD, Zhang MF. Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of *Brassica juncea*. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 9. [DOI]
- [35] Zhu Z, Zhou CC, Yang J. Molecular phenotypes associated with anomalous stamen development in *Alternanthera philoxeroides*. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 242. [DOI]
- [36] Chen P, Ran SM, Li R, Huang ZP, Qian JH, Yu ML, Zhou RY. Transcriptome *de novo* assembly and differentially expressed genes related to cytoplasmic male sterility in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Mol Breeding*, 2014, 34(4): 1879–1891. [DOI]
- [37] Rhee SJ, Seo M, Jang YJ, Cho S, Lee GP. Transcriptome profiling of differentially expressed genes in floral buds and flowers of male sterile and fertile lines in watermelon. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 601. [DOI]
- [38] Jiang JX, Lv ML, Liang Y, Ma ZM, Cao JS. Identification of novel and conserved miRNAs involved in pollen development in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* by high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 146. [DOI]
- [39] Wei XC, Zhang XH, Yao QJ, Yuan YX, Li XX, Wei F, Zhao YY, Zhang Q, Wang ZY, Jiang WS, Zhang XW. 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. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 894. [DOI]
- [40] Shemesh-Mayer E, Ben-Michael T, Rotem N, Rabino-witch HD, Doron-Faigenboim A, Kosmala A, Perlikowski D, Sherman A, Kamenetsky R. Garlic (*Allium sativum* L.) fertility: transcriptome and proteome analyses provide insight into flower and pollen development. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 271. [DOI]
- [41] Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*, 2003, 19(3): 368–375. [DOI]
- [42] Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, Sugawara S,

- Tohge T, Ito T, Koyanagi M, Kitajima M, Takayama H, Saito K. A flavonoid 3-*O*-glucoside: 2"-*O*-glucosyltransferase responsible for terminal modification of pollen-specific flavonols in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2014, 79(5): 769–782. [DOI]
- [43] Bhogale S, Mahajan AS, Natarajan B, Rajabhoj M, Thulasiram HV, Banerjee AK. *MicroRNA156*: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiol*, 2014, 164(2): 1011–1027. [DOI]
- [44] Wang L, Sun SY, Jin JY, Fu DB, Yang XF, Weng XY, Xu CG, Li XH, Xiao JH, Zhang QF. Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(50): 15504–15509. [DOI]
- [45] Nie Z, Ren ZY, Wang LB, Su SZ, Wei X, Zhang X, Wu L, Liu D, Tang HT, Liu HL, Zhang SZ, Gao SB. Genome-wide identification of microRNAs responding to early stages of phosphate deficiency in maize. *Physiol Plant*, 2016, 157(2): 161–174. [DOI]
- [46] Xie ZX, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2004, 2(5): e104. [DOI]
- [47] Li XM, Sang YL, Zhao XY, Zhang XS. High-throughput sequencing of small RNAs from pollen and silk and characterization of miRNAs as candidate factors involved in pollen-silk interactions in maize. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72852. [DOI]
- [48] Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arévalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen R A, Vielle-Calzada JP. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature*, 2010, 464(7288): 628–632. [DOI]
- [49] Li ZF, Zhang YC, Chen YQ. miRNAs and lncRNAs in reproductive development. *Plant Sci*, 2015, 238: 46–52. [DOI]
- [50] Niu SH, Liu C, Yuan HW, Li P, Li Y, Li W. Identification and expression profiles of sRNAs and their biogenesis and action-related genes in male and female cones of *Pinus tabulaeformis*. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 418. [DOI]
- [51] Wu MF, Tian Q, Reed JW. *Arabidopsis microRNA-167* controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development*, 2006, 133(21): 4211–4218. [DOI]
- [52] Xing SP, Salinas M, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P. factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 22(12): 3935–3950. [DOI]
- [53] Ding JH, Lu Q, Ouyang YD, Mao HL, Zhang PB, Yao JL, Xu CG, Li XH, Xiao JH, Zhang QF. A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(7): 2654–2659. [DOI]
- [54] Zhou H, Liu QJ, Li J, Jiang DG, Zhou LY, Wu P, Lu S, Li F, Zhu LY, Liu ZL, Chen LT, Liu YG, Zhuang CX. Photoperiod- and thermo-sensitive genic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA. *Cell Res*, 2012, 22(4): 649–660. [DOI]
- [55] Luo Y, Guo ZH, Li L. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. *Dev Biol*, 2013, 380(2): 133–144. [DOI]
- [56] Ru P, Xu L, Ma H, Huang H. Plant fertility defects induced by the enhanced expression of microRNA167. *Cell Res*, 2006, 16(5): 457–465. [DOI]
- [57] Srivastava S, Zheng Y, Kudapa H, Jagadeeswaran G, Hirviale V, Varshney RK, Sunkar R. High throughput sequencing of small RNA component of leaves and inflorescence revealed conserved and novel miRNAs as well as phasiRNA loci in chickpea. *Plant Sci*, 2015, 235: 46–57. [DOI]
- [58] Wilson ZA, Zhang DB. From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *J Exp Bot*, 2009, 60(5): 1479–1492. [DOI]
- [59] Dukowic-Schulze S, Harris A, Li JH, Sundararajan A, Mudge J, Retzel EF, Pawlowski WP, Chen CB. Comparative transcriptomics of early meiosis in *Arabidopsis* and maize. *J Genet Genomics*, 2014, 41(3): 139–152. [DOI]
- [60] Jiang Y, Zeng B, Zhao HN, Zhang M, Xie SJ, Lai JS. Genome-wide transcription factor gene prediction and their expressional tissue-specificities in maize. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54(9): 616–630. [DOI]
- [61] Liu YM, Zhang L, Zhou JY, Cao MJ. Research progress of the bHLH transcription factors involved in genic male sterility in plants. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(12): 1194–1203.
- 刘永明, 张玲, 周建瑜, 曹墨菊. 植物细胞核雄性不育相关 bHLH 转录因子研究进展. *遗传*, 2015, 37(12): 1194–1203. [DOI]
- [62] Zhang YC, Liao JY, Li ZY, Yu Y, Zhang JP, Li QF, Qu LH, Shu WS, Chen YQ. Genome-wide screening and functional analysis identify a large number of long non-coding RNAs involved in the sexual reproduction of rice.

- Genome Biol*, 2014, 15(12): 669. [DOI]
- [63] Ma XD, Xing CZ, Guo LP, Gong YC, Wang HL, Zhao YL, Wu JY. Analysis of differentially expressed genes in genic male sterility cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using cDNA-AFLP. *J Genet Genomics*, 2007, 34(6): 536–543. [DOI]
- [64] Liu XM, Liu Y, Liu C, Guan MX, Yang CP. Identification of genes associated with male sterility in a mutant of white birch (*Betula platyphylla* Suk.). *Gene*, 2015, 574(2): 247–254. [DOI]
- [65] Ma X, Feng BM, Ma H. AMS-dependent and independent regulation of anther transcriptome and comparison with those affected by other *Arabidopsis* anther genes. *BMC Plant Biol*, 2012, 12(1): 23. [DOI]
- [66] Feng BM, Lu DH, Ma X, Peng YB, Sun YJ, Ning G, Ma H. Regulation of the *Arabidopsis* anther transcriptome by DYT1 for pollen development. *Plant J*, 2012, 72(4): 612–624. [DOI]
- [67] Zhou H, Zhou M, Yang YZ, Li J, Zhu LY, Jiang DG, Dong JF, Liu QJ, Gu LF, Zhou LY, Feng MJ, Qin P, Hu XC, Song CL, Shi JF, Song XW, Ni ED, Wu XJ, Deng QY, Liu ZL, Chen MS, Liu YG, Cao XF, Zhuang CX. RNase Z<sup>S1</sup> processes *Ubl40* mRNAs and controls thermo-sensitive genic male sterility in rice. *Nat Commun*, 2014, 5: 4884. [DOI]
- [68] Lu CR, Zou CS, Song GL. Recent progress in gene mapping through high-throughput sequencing technology and forward genetic approaches. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(8): 765–776.
- 陆才瑞, 邹长松, 宋国立. 高通量测序技术结合正向遗传学手段在基因定位研究中的应用. *遗传*, 2015, 37(8): 765–776. [DOI]
- [69] Zhang H, Liang WQ, Zhang DB. Research progress on tapetum programmed cell death. *J Shanghai Jiaotong Univ (Agr Sci)*, 2008, 26(1): 86–90.
- 张虹, 梁婉琪, 张大兵. 花药绒毡层细胞程序性死亡研究进展. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2008, 26(1): 86–90. [DOI]
- [70] Ouyang YD, Liu YG, Zhang QF. Hybrid sterility in plant: stories from rice. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(2): 186–192. [DOI]
- [71] Lee YP, Cho Y, Kim S. A high-resolution linkage map of the *Rfd1*, a restorer-of-fertility locus for cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.) produced by a combination of bulked segregant analysis and RNA-Seq. *Theor Appl Genet*, 2014, 127(10): 2243–2252. [DOI]
- [72] Kim S, Kim CW, Park M, Choi D. Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. *Theor Appl Genet*, 2015, 128(11): 2289–2299. [DOI]
- [73] Bisht DS, Chamola R, Nath M, Bhat SR. Molecular mapping of fertility restorer gene of an alloplasmic CMS system in *Brassica juncea* containing *Moricandia arvensis* cytoplasm. *Mol Breeding*, 2015, 35(1): 1–11. [DOI]
- [74] Li X, Li L, Yan JB. Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize. *Nat Commun*, 2015, 6: 6648. [DOI]

(责任编辑: 赵方庆)