

网络出版时间:2019-01-24 16:29

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.08.005

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190124.1627.010.html

基于转录组测序对紫花苜蓿细胞质雄性不育系 相关代谢通路的鉴定

陈晶晶¹,王英哲²,郭强¹,李海静¹,徐博¹

(1 吉林农业大学 动物科学技术学院,吉林 长春 130118;2 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所,吉林 长春 130118)

【摘要】【目的】研究紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)细胞质雄性不育(CMS)的机理,为紫花苜蓿利用不育系的育种工作提供理论基础。【方法】本研究以紫花苜蓿细胞质雄性不育系 MSGN1A 及其保持系 MSGN1B 为材料,进行转录组测序(RNA-Seq)以及基因功能注释,筛选与不育系机理相关的差异表达基因及代谢通路。【结果】Illumina 测序共得到紫花苜蓿 95 679 条功能基因,经过差异表达分析筛选出 187 个显著差异表达的基因(DEGs),其中包括 18 个上调基因,169 个下调基因。采用 GO、KEGG、COG 注释库分别对 187 个 DEGs 进行功能注释,其主要涉及催化活性、代谢活动、信号传导机制、合成、膜功能、碳水化合物运输和代谢、能量代谢等相关通路。【结论】筛选出与紫花苜蓿细胞质雄性不育性相关的代谢通路,初步探讨了紫花苜蓿细胞质雄性不育系的分子机理。

【关键词】紫花苜蓿;细胞质雄性不育;转录组测序

【中图分类号】S541+.101;Q789

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2019)08-0031-06

Identification of metabolic pathways related to cytoplasmic male sterility of *Medicago sativa* L. by transcriptome sequencing

CHEN Jingjing¹, WANG Yingzhe², GUO Qiang¹, LI Haijing¹, XU Bo¹

(1 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】The cytoplasmic male sterility (CMS) mechanism was studied to enhance the use of sterile lines of alfalfa in breeding. 【Method】RNA-sequencing was performed to identify genes involving in CMS line MSGN1A and maintainer line MSGN1B. The genes function annotation analysis was conducted and the differences in gene expression and correlated metabolism pathways were investigated. 【Result】A total of 95 679 unigenes were obtained by Illumina sequencing and 187 differentially expressed genes (DEGs) were identified with 18 up-regulated genes and 169 down-regulated genes. Based on GO, KEGG, and COG database, these DEGs were related to catalytic activity, metabolic process, signal transduction mechanisms, binding, membrane function, carbohydrate transport and metabolism, as well as energy metabolism. 【Conclusion】The CMS related metabolism pathways were identified and the molecular mechanism of sterile lines of alfalfa was preliminarily revealed.

Key words: *Medicago sativa* L.; cytoplasmic male sterility; transcriptome sequencing

【收稿日期】2018-05-03

【基金项目】国家自然科学基金项目(31402125);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20180666KJ);国家牧草产业技术体系项目(CARS35-02);公益性行业(农业)科研专项“东北寒冷半湿润区苜蓿高效种植技术研究与示范”(201403048-0400)

【作者简介】陈晶晶(1994—),女,陕西安康人,在读硕士,主要从事牧草种质资源与遗传育种研究。

E-mail:chenjingjing617@163.com

【通信作者】徐博(1983—),男,吉林公主岭人,讲师,博士,主要从事牧草种质资源与遗传育种研究。E-mail:xubo0308@126.com

细胞质雄性不育(CMS)是高等植物常见的生物学特性,是指 CMS 植物不能产生正常的花药、花粉或雄配子^[1-3]。由于细胞质雄性不育系在杂交种子生产中具有重要价值,前人已经鉴定出许多作物品种的细胞质雄性不育系,如棉花(*Gossypium hirsutum* L.)、大豆(*Glycine max* L.)、胡萝卜(*Daucus carota* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、洋葱(*Allium cepa* L.)、甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)和小麦(*Triticum aestivum* L.)^[4-5]。紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是世界上最重要的豆科牧草之一,因其具有优良的营养品质以及较高的饲草产量而被广泛种植^[6-7]。吴永敷^[8]在 1978 年从草原 1 号中发现了 6 株紫花苜蓿雄性不育系,于洪柱等^[9]在 2008 年发现了紫花苜蓿细胞质雄性不育系材料—MS-GN。

转录组测序是近年来新开发的一种高性能分析方法,运用该技术可以在一个试验中对数千个基因进行比较和分析,有助于发现新的基因和转录因子^[10-13]。因此,众多学者采用转录组测序技术对 CMS 作物的不育机理进行研究。Suzuki 等^[14]对棉花细胞质雄性不育系和恢复系进行了转录组分析,结果表明与 CMS 相关的基因主要参与了细胞壁的扩增。Li 等^[15]采用转录组测序分析大豆细胞质雄性不育系 NJCMS1A 及其保持系 NJCMS1B,认为不育系 NJCMS1A 的雄性不育可能与一些关键差异表达基因功能紊乱和代谢途径异常相关,如碳水化合物能量代谢、转录因子、花粉发育、活性氧(ROS)清除体系、细胞信号转导和细胞程序性死亡(PCD)等。然而,截至目前,尚未发现紫花苜蓿细胞质雄性不育系转录组测序的相关研究。

在前人研究的基础上,笔者发现紫花苜蓿细胞质雄性不育系的花粉发育不良及育性丧失可能是由基因突变引起的,但其分子机理尚不清楚。因此,本研究以紫花苜蓿细胞质雄性不育系及其保持系的花药为材料,进行转录组测序,得到与细胞质雄性不育相关的通路及基因,进一步筛选差异基因,为后续研究其不育机理及基因表达分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫花苜蓿细胞质雄性不育系 MSGN1A(以公农-3 号为供体母本,保持系 MSGN1B 作为轮回亲本,回交四代所得)及其保持系 MSGN1B,均由吉林省农业科学院提供。2016 年 4 月,将 MSGN1A 和

MSGN1B 种植于吉林省长春市吉林农业大学草业科学试验田,选取现蕾期 24 h(阶段 I)、48 h(阶段 II)和 60 h(阶段 III)的花蕾,去除花瓣及托叶,保留花药部分,每个时期各取样品 50 mg,等量混合保存于液氮罐中,备用。试验设置 3 个生物学重复。

1.2 试验方法

1.2.1 MSGN1A 和 MSGN1B 花药总 RNA 的提取及质量控制 参照 Garg 等^[16]的方法提取 MSGN1A 和 MSGN1B 花药总 RNA,再用紫外分光光度计分别在 230、260 和 280 nm 处测定吸光值(OD_{230} 、 OD_{260} 和 OD_{280}),要求 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 均 ≥ 1.8 。运用 Agilent 2100 生物分析仪检测总 RNA 的完整性,总 RNA 完整性值在 8.0~10.0 的样品可用于后续试验。

1.2.2 cDNA 文库的制备与检测 cDNA 文库的制备与检测由北京百迈客生物技术公司完成。总 RNA 经过 DNase 消化、mRNA 富集、mRNA 打断后,反转录合成 cDNA 第一链。以 cDNA 第一链为模板,反转录合成 cDNA 第二链。对双链 cDNA 进行纯化,然后进行末端修复,最后在 3' 末端加上 A 碱基,并连接测序接头(3' 端接头为 AGATCG-GAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC; 5' 端接头为 AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG-GAAAGAGTGT)。连接产物经胶回收后进行 PCR 反应及产物回收,cDNA 文库构建完成。分别使用 Qubit 2.0 和 Agilent 2100 对 cDNA 文库进行检测,使用 q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。

1.2.3 转录组测序及测序数据组装 转录组测序及测序数据组装均由北京百迈客生物技术公司完成。应用 Illumina Hiseq 2000 平台进行转录组文库测序,测序条件为:PE150,双端序列 150 bp。对原始序列进行数据过滤,去除其中的接头序列及低质量序列,获得高质量的去冗余序列。采用 Trinity 软件进行序列组装,获得紫花苜蓿的功能基因。

1.2.4 功能基因差异表达分析及功能注释 根据功能基因在不育系 MSGN1A 和保持系 MSGN1B 样品中的表达量进行差异表达分析(以 $FDR < 0.01$ 和 $FC > 2$ 作为筛选 MSGN1A 和 MSGN1B 之间差异表达基因(DEGs)的阈值)及差异表达基因的功能注释。功能注释由北京百迈客生物技术公司进行,功能注释的数据库为 GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.ge->

nome.jp/kegg/)、COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins/orthologous groups of genes)。

2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿 MSGN1A 和 MSGN1B 总 RNA 质量分析

对提取的紫花苜蓿 MSGN1A 和 MSGN1B 花

表 1 紫花苜蓿 MSGN1A 和 MSGN1B 总 RNA 质量检测结果

样品 Sample	完整性值 RNA integrity number	RNA 浓度/(ng·μL ⁻¹) RNA concentration	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀
MSGN1A	9.2	158	2.16	2.32
MSGN1B	8.9	163	2.14	2.29

2.2 紫花苜蓿转录组测序及测序数据分析

利用 Illumina Hiseq 2000 平台对紫花苜蓿细胞质雄性不育系 MSGN1A 及其保持系 MSGN1B 的花药进行转录组测序分析,结果如表 2 所示。由表 2 可知,紫花苜蓿转录组测序共获得去冗余序列 54.43 G,其中不育系去冗余序列为 27.43 G,G+C 含量为 41.98%,质量值(Q)大于等于 30 的碱基占 91.21%;保持系去冗余序列为 27.00G,G+C 含量

药总 RNA 的质量进行检测,检测结果如表 1 所示。由表 1 可知,紫花苜蓿不育系 MSGN1A 和保持系 MSGN1B 花药总 RNA 完整性值均大于 8.0,且 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均大于 1.9,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值均大于 2.0,总 RNA 质量浓度分别为 158 和 163 ng/μL,说明样品总 RNA 的完整性与纯度合格达到测序要求。

为 41.90%,质量值大于等于 30 的碱基占 90.99%。

采用 Trinity 软件对去冗余后的高质量序列进行组装,获得 172 483 个转录本 (Transcripts) 和 95 679 个功能基因 (Unigenes),不同长度转录本、功能基因的条数及其比例见表 3。转录本和功能基因的总长度分别达到 160 772 822 和 73 481 347 bp;转录本平均长度为 932.11 bp,N50 为 1 437 bp;功能基因平均长度为 768 bp,N50 为 1 209 bp。

表 2 紫花苜蓿转录组测序数据统计结果

样品 Sample	去冗余序列数量/Gb Total clean reads	碱基 G+C 含量/% G+C content	Q≥30 碱基百分比/% Q≥30 base percentage
MSGN1A	27 434 998 344	41.98	91.21
MSGN1B	26 991 049 938	41.90	90.99

表 3 紫花苜蓿转录本和功能基因长度分布和数目统计

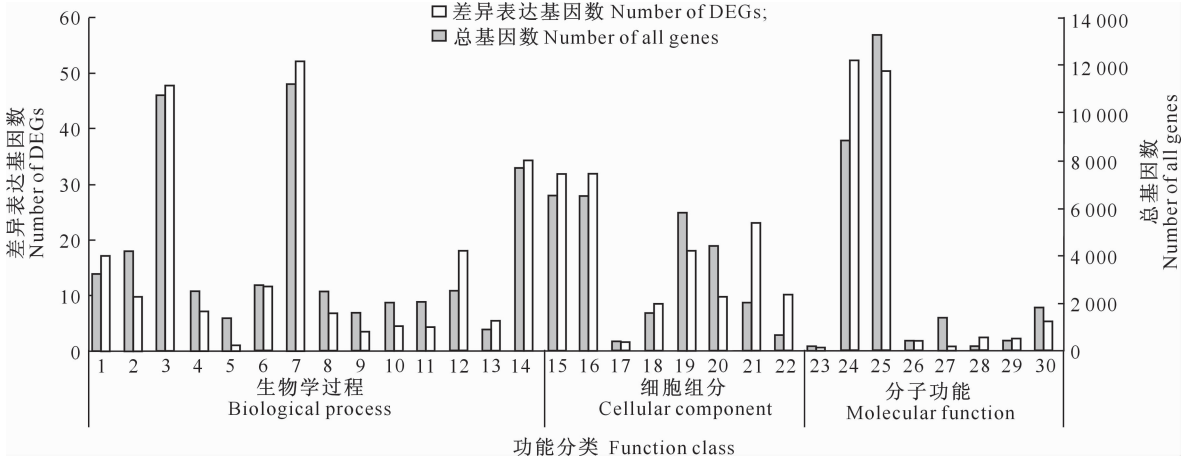
长度分布/bp Length range	转录本 Transcripts		功能基因 Unigenes	
	条数 Number	比例/% Ratio	条数 Number	比例/% Ratio
201~300	34 295	19.88	28 607	29.90
301~500	37 215	21.58	22 792	23.82
501~1 000	47 098	27.31	22 690	23.71
1 001~2 000	35 217	20.42	14 221	14.86
>2000	18 658	10.82	7 369	7.70
总数 Total number	172 483		95 679	

2.3 紫花苜蓿功能基因差异表达分析及其功能注释

2.3.1 DEGs 分析 与保持系 MSGN1B 相比,紫花苜蓿不育系 MSGN1A 有 187 个 DEGs,其中 169 个表达下调,18 个表达上调。

2.3.2 GO 功能注释 在序列同源性(≥80%)的基础上,对 187 个 DEGs 进行 GO 功能注释,结果(图 1)有 3 个上调和 84 个下调的 DEGs 被标记为 30 个功能类别,其中包括 14 个生物学过程,8 个细胞组分和 8 个分子功能。生物学过程功能类别中,

代谢过程是主要的功能类别,其次是细胞过程、信号生物过程、细胞成分组织或生物合成、生物调节等。在细胞组分功能类别中,细胞和细胞分离是主要的功能类别,其次是生物膜、膜分离等。分子功能类别中,催化活性是最主要的功能类别,紧随其后的是合成、转运活性、分子功能调控等功能类别。这证明了催化活性、代谢过程、细胞过程、合成、信号生物过程、生物膜和膜分离等功能可能与紫花苜蓿细胞质雄性不育相关。

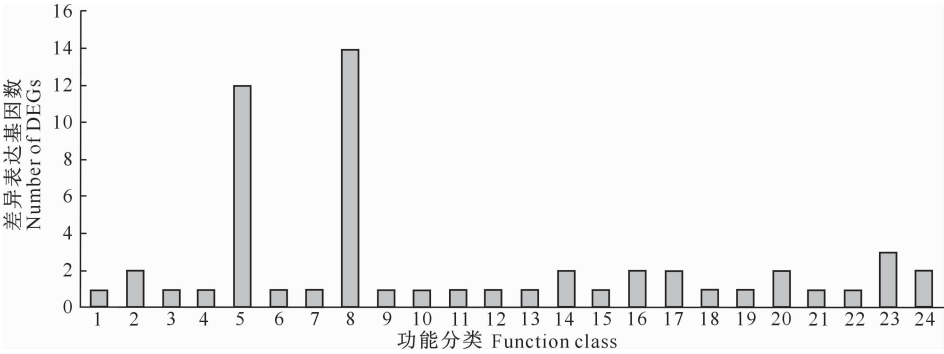


1. 生物调节;2. 细胞成分组织或生物合成;3. 细胞过程;4. 发育过程;5. 生长;6. 定位;7. 代谢过程;8. 多细胞生物过程;9. 多生物过程;
10. 繁殖;11. 繁殖过程;12. 刺激反应;13. 信号;14. 信号生物过程;15. 细胞;16. 细胞分离;17. 胞外区;18. 高分子配合物;
19. 生物膜;20. 膜分离;21. 细胞器;22. 细胞器分离;23. 抗氧化活性;24. 合成;25. 催化活性;26. 电子传递体活性;
27. 分子功能调控;28. 核酸合成转录因子活性;29. 结构分子活性;30. 转运活性
1. Biological regulation;2. Cellular component organization or biogenesis;3. Cellular process;4. Developmental process;
5. Growth;6. Localization;7. Metabolic process;8. Multicellular organismal process;9. Multi-organism process;
10. Reproduction;11. Reproductive process;12. Response to stimulus;13. Signaling;14. Single-organism process;
15. Cell;16. Cell part;17. Extracellular region;18. Macromolecular complex;19. Membrane;20. Membrane part;21. Organelle;
22. Organelle part;23. Antioxidant activity;24. Binding;25. Catalytic activity;26. Electron carrier activity;27. Molecular
function regulator;28. Nucleic acid binding transcription factor activity;29. Structural molecule activity;30. Transporter activity

图 1 紫花苜蓿细胞质雄性不育系 MSGN1A 差异表达基因的 GO 功能注释

Fig. 1 Histogram showing GO function annotation of DEGs of alfalfa CMS line MSGN1A

2.3.3 KEGG 通路分析 为了识别 DEGs 参与的 进行分析,结果如图 2 所示。
代谢途径,通过 KEGG 通路数据库对 187 个 DEGs



1. 类黄酮生物合成;2. 苯丙素的生物合成;3. 缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的生物合成;4. 泛素介导的蛋白水解作用;5. 戊糖、葡萄糖醛酸转换;
6. 泛酸酯和 CoA 生物合成;7. 内质网蛋白加工;8. 淀粉和蔗糖代谢;9. 糖胺聚糖降解;10. 缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸降解;11. 自噬调节;
12. 2-氧代羧酸代谢;13. 氨基糖和核苷酸糖代谢;14. 植物病原菌互作;15. 氨基酸的生物合成;16. 植物激素信号转导;17. RNA 转运;18. 半胱氨酸和蛋氨酸代谢;
19. 氨酰生物合成;20. 囊泡运输中的 SNARE 蛋白相互作用;21. 鞘脂类代谢;22. 核糖体;23. 氧化磷酸化;24. 色氨酸酸代谢
1. Flavonoid biosynthesis;2. Phenylpropanoid biosynthesis;3. Valine,leucine and isoleucine biosynthesis;4. Ubiquitin mediated proteolysis;
5. Pentose and glucuronate interconversions;6. Pantothenate and CoA biosynthesis;7. Protein processing in endoplasmic reticulum;
8. Starch and sucrose metabolism;9. Glycosaminoglycan degradation;10. Valine,leucine and isoleucine degradation;
11. Regulation of autophagy;12. 2-Oxocarboxylic acid metabolism;13. Amino sugar and nucleotide sugar metabolism;
14. Plant-pathogen interaction;15. Biosynthesis of amino acids;16. Plant hormone signal transduction;17. RNA transport;
18. Cysteine and methionine metabolism;19. Aminoacyl-tRNA biosynthesis;20. SNARE interactions in vesicular transport;
21. Sphingolipid metabolism;22. Ribosome;23. Oxidative phosphorylation;24. Cyan amino acid metabolism

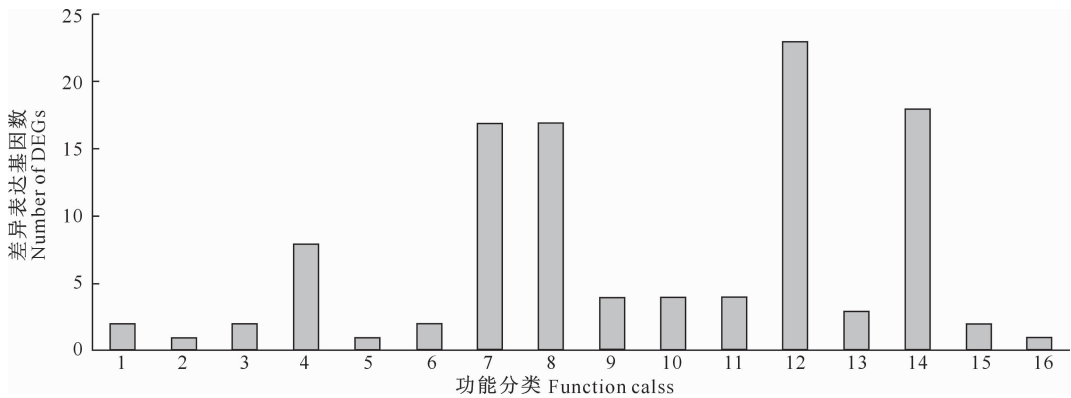
图 2 紫花苜蓿细胞质雄性不育系 MSGN1A 差异表达基因的 KEGG 功能分类

Fig. 2 Histogram showing KEGG function classification of DEGs of alfalfa CMS line MSGN1A

由图 2 可知,在 187 个 DEGs 中有 4 个上调和 33 个下调 DEGs 被注释到 24 个 KEGG 通路,其中淀粉和蔗糖代谢是最具代表性的途径(KEGG 通路编号为 ko00500,共 14 个 DEGs,下同),其次是戊糖、葡萄糖醛酸转换(ko00040,12),氧化磷酸化(ko00190,3),植物激素信号转导(ko04626,2),植物-病原菌互作(ko04626,2),RNA 转运(ko04130,2),苯丙素的生物合成(ko00940,2)。少数几个基因参加了自噬调节(ko04140,1),半胱氨酸和蛋氨酸代谢(ko00270,1),泛酸酯和 CoA 生物合成(ko00770,1)等。试验结果表明,与紫花苜蓿细胞质雄性不育相关的主要代谢通路包括碳水化合物代谢通路,戊糖、葡萄糖醛酸转换通路,氧化磷酸化通路等。

2.3.4 COG 功能分类 对 187 个 DEGs 进行 COG 功能分类,共有 50 个 DEGs(原始结果为 109

个 DEGs,但其中包括 59 个重复 DEGs,剔除重复后实际为 50 个 DEGs)注释到 16 个 COG 功能类别(图 3),其中 3 个为上调 DEGs,47 个为下调 DEGs。在 COG 功能分类中,一般功能预测(有 23 个 DEGs,占比为 21.1%(23/109),下文同)是最具代表性的分类;其次是信号传导机制(18,16.51%),转录(17,15.6%),复制、重组和修复(17,15.6%);再次是碳水化合物运输和代谢(8,8.34%),细胞壁/膜的生物合成(4,3.67%),次级代谢产物生物合成、运输和分解代谢(4,3.6%),无机离子的转运和代谢(4,3.67%);其他功能分类的 DEGs 及其占比较低。结果表明,信号传导机制,转录、复制、重组和修复,碳水化合物运输和代谢,细胞壁/膜/包膜生物发生可能涉及到紫花苜蓿的细胞质雄性不育。



1. 能量产生与转换;2. 细胞周期控制,细胞分裂,染色体分裂;3. 氨基酸运输和代谢;4. 碳水化合物运输和代谢;5. 辅酶的运输和代谢;
6. 翻译、核糖体结构和生物起源;7. 转录;8. 复制、重组和修复;9. 细胞壁/膜/包膜生物发生;10. 无机离子的转运和代谢;
11. 次生代谢物生物合成、转运和分解代谢;12. 一般功能预测;13. 功能未知;14. 信号传导机制;15. 胞内运输、分泌和囊泡运输;16. 细胞骨架
1. Energy production and conversion;2. Cell cycle control,cell division,chromosome partitioning;3. Amino acid transport and metabolism;4. Carbohydrate transport and metabolism;5. Coenzyme transport and metabolism;6. Translation,ribosomal structure and biogenesis;7. Transcription;8. Replication,recombination and repair;9. Cell wall/membrance/envelope biogenesis;
10. Inorganic ion transport and metabolism;11. Secondary metabolites biosynthesis,transport and catabolism;
12. General function prediction only;13. Function unknown;14. Signal transduction mechanisms;
15. Intracellular trafficking, secretion,and vesicular transport;16. Cytoskeleton

图 3 紫花苜蓿细胞质雄性不育系 MSGN1A 差异表达基因的 COG 功能分类

Fig. 3 Histogram showing COG function classification of DEGs of alfalfa CMS line MSGN1A

3 结论与讨论

在花粉发育过程中,酶可以催化葡萄糖、淀粉和其他糖类物质的合成^[17]。而糖类物质是植物体内重要的能源物质^[18],因此,糖类物质代谢与花粉发育息息相关。由 KEGG 通路注释结果可知,本研究筛选出了 14 个涉及淀粉、蔗糖代谢的 DEGs 和 12 个涉及戊糖和葡萄糖酸盐互换的 DEGs,这些基因全部下调表达,表明紫花苜蓿细胞质雄性不育系

MSGN1A 中这 17 个基因(剔除重复的 9 个基因)的表达水平低于其保持系 MSGN1B,导致不育系糖类物质合成与代谢异常,从而致使不育系花粉育性丧失。另外,从 COG 分析结果可知,8 个 DEGs 与碳水化合物运输和代谢过程相关。这与 Dong 等^[19]在大白菜 CMS 中发现碳水化合物代谢相关 DEGs 下调表达的结果类似。

Cao 等^[20]研究发现,在绒毡层细胞中 Ca²⁺-ATPase 的异常分布会影响正常细胞程序性死亡

(PCD),且不能正常降解绒毡层细胞,小孢子发育所需的能量及营养不能及时供应,导致花粉败育。本研究 KEGG 数据库中注释到,2 个能量产生和代谢的 DEGs 下调表达,3 个 DEGs 与氧化磷酸化有关且下调表达,而氧化磷酸化是合成三磷酸腺苷(ATP)的重要途径之一,也是能量转换的重要方式^[21],因此认为 MSGN1A 中与能量代谢和氧化磷酸化相关的基因表达异常,导致 MSGN1A 花粉中 ATP 合成受阻,最终使得花粉因能量不足而败育。

Rato 等^[22]研究发现,花粉管的生长依赖于多种信号通路,其中钙调蛋白是钙离子信号通路中的关键因子。Yang 等^[23]研究认为,在大豆 CMS 中,12 个 DEGs 的差异表达可能导致钙信号通路被破坏、花粉发育异常以及细胞质雄性不育系 NJCMS1A 不育。而在本研究中,由 COG 对差异表达基因的功能分类可知,有 18 个 DEGs 参与了信号传导,其中 17 个 DEGs 在 MSGN1A 中表达下调,表明这些 DEGs 影响了信号传导机制,也充分证明了信号传导机制对紫花苜蓿的雄性不育性至关重要。

本研究运用转录组测序技术,对紫花苜蓿细胞质雄性不育系 MSGN1A 及其保持系 MSGN1B 进行转录组分析和差异表达分析,通过不同数据库对其功能基因进行注释,筛选出与细胞质雄性不育性相关的代谢通路,初步探讨了紫花苜蓿不育系的分子机理,为紫花苜蓿利用不育系的育种工作提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] Schnable P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration [J]. Trends in Plant Science, 1998(3): 175-180.
- [2] Wang S, Wang C, Zhang X X, et al. Transcriptome de novo, assembly and analysis of differentially expressed genes related to cytoplasmic male sterility in cabbage [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2016(105): 224-232.
- [3] Han Z, Qin Y, Deng Y, et al. Expression profiles of a cytoplasmic male sterile line of *Gossypium harknessii* and its fertility restorer and maintainer lines revealed by RNA-seq [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2017(116): 106-115.
- [4] Qiu Y, Liao L, Jin X, et al. Analysis of the meiotic transcriptome reveals the genes related to the regulation of pollen abortion in cytoplasmic male-sterile pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Gene, 2018(641): 8-17.
- [5] Yuan Q, Song C, Gao L, et al. Transcriptome de novo assembly and analysis of differentially expressed genes related to cytoplasmic male sterility in onion [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2018(125): 35-44.
- [6] 杨青川, 孙彦. 紫花苜蓿在北京市种植业结构调整中的作用 [J]. 北京农业科学, 2000, 18(3): 38-40.
Yang Q C, Sun Y. The role of alfalfa in the structural adjustment of Beijing planting industry [J]. Beijing Agricultural Sciences, 2000, 18(3): 38-40.
- [7] 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 (Nat Sci Ed), 2015, 43(5): 12-20.
- [8] 吴永敷. 苜蓿雄性不育系的选育 [J]. 中国草原, 1980, 2(2): 36-38.
Wu Y F. The breeding of alfalfa male sterile lines [J]. China's Grassland, 1980, 2(2): 36-38.
- [9] 于洪柱, 徐安凯, 栾博宇, 等. 紫花苜蓿雄性不育系的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(17): 81-82.
Yu H Z, Xu A K, Luan B Y, et al. Study on male sterile line of *Medicago sativa* [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2013(17): 81-82.
- [10] Denoeud F, Aury J M, Da S C, et al. Annotating genomes with massive-scale RNA sequencing [J]. Genome Biology, 2008, 9(12): 1-12.
- [11] Schuster S C. Next-generation sequencing transforms today's biology [J]. Nat Methods, 2008(5): 16-18.
- [12] Ansorge W J. Next-generation DNA sequencing techniques [J]. N Biotechnol, 2009(25): 195-203.
- [13] Zenoni S, Ferrarini A, Giacomelli E, et al. Characterization of transcriptional complexity during berry development in vitis vinifera using RNA-seq [J]. Plant Physiol, 2010(152): 1787-1795.
- [14] Suzuki H, Rodriguez-Urbe L, Xu J, et al. Transcriptome analysis of cytoplasmic male sterility and restoration in CMS-D8 cotton [J]. Plant Cell Reports, 2013(32): 1531-1542.
- [15] Li J, Han S, Ding X, et al. Comparative transcriptome analysis between the cytoplasmic male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. PLoS ONE, 2015(10): e0126771.
- [16] Garg R, Patel R K, Tyagi A K, et al. De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification [J]. DNA Research, 2011, 18(1): 53-63.
- [17] Miernyk J, Pretová A, Olmedilla A, et al. Using proteomics to study sexual reproduction in angiosperms [J]. Sex Plant Reprod, 2011(24): 9-22.
- [18] 尚丽. 拟南芥糖反应相关基因 TANG1 的克隆及功能分析 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2016.
Shang L. Cloning and functional analysis of TANG1 gene related to *Arabidopsis thaliana* carbohydrate response [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2016.

[M]. Japan: Radiometric Instruments Operation, 1989: 17-21.

[18] Kokaly R F, Clark R N. Spectroscopic determination of leaf biochemistry using band-depth analysis of absorption features and step wise multiplelinear regression [J]. Remote Sensing of Environment, 1999, 67(3): 267-287.

[19] Curran P J, Dungan J L, Peterson D L. Estimating the foliar biochemical concentration of leaves with reflectance spectrometry: testing the Kokaly and Clark methodologies [J]. Remote Sensing of Environment, 2001, 76: 349-359.

[20] 张金恒. 基于连续统去除法的水稻氮素营养光谱诊断 [J]. 植物生态学报, 2006(1): 78-82.

Zhang J H. Rice nitrogen nutrition diagnosis using continuum-removed reflectance [J]. Journal of Plant Ecology, 2006(1): 78-82.

[21] 郭超凡, 郭逍宇. 基于可见光波段包络线去除的湿地植物叶片叶绿素估算 [J]. 生态学报, 2016, 36(20): 6538-6546.

Guo C F, Guo X Y. Estimation of wetland plant leaf chlorophyll content based on continuum removal in the visible domain [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(20): 6538-6546.

[22] 张雪红, 刘绍民, 何蓓蓓. 基于包络线消除法的油菜氮素营养高光谱评价 [J]. 农业工程学报, 2008, 24(10): 151-155.

Zhang X H, Liu S M, He B B. Hyperspectral evaluation of rape nitrogen nutrition using continuum removed method [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008, 24(10): 151-155.

[23] 张雪红, 田庆久. 基于连续统去除法的冬小麦叶片氮积累量的高光谱评价 [J]. 生态学报, 2010, 29(1): 181-186.

Zhang X H, Tian Q J. Hyperspectral evaluation of nutrition accumulation in winter wheat leaves based on continuum-removed method [J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(1): 181-186.

[24] Mutanga O, Skidmore A K, Kumar L, et al. Estimating tropical pasture quality at canopy level using band depth analysis with continuum removal in the visible domain [J]. International Journal of Remote Sensing, 2005, 26(6): 1093-1108.

[25] 李粉玲, 常庆瑞. 基于连续统去除法的冬小麦叶片全氮含量估算 [J]. 农业机械学报, 2017, 48(7): 174-179.

Li F L, Chang Q R. Estimation of winter wheat leaf nitrogen content based on continuum removed spectra [J]. Transaction of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(7): 174-179.

[26] 陈圣波, 周 超, 王晋年. 黑龙江多金属矿区植物胁迫光谱及其与金属元素含量关系研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(5): 1310-1315.

Chen S B, Zhou C, Wang J N. Vegetation stress spectra and their relations with the contents of metal elements within the plant leaves in metal mines in Heilongjiang [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012, 32(5): 1310-1315.

(上接第 36 页)

[19] Dong X, Kim W, Lim Y, et al. Ogura-CMS in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) causes delayed expression of many nuclear genes [J]. Plant Sci, 2013(199/200): 7-17.

[20] Cao Y. Anomalous changes in Ca^{2+} -ATPase distribution during the process of pollen abortion in *Populus tomentosa* Carr [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2012(34): 10-17.

[21] 杨福愉. 氧化磷酸化机制的研究近况 [J]. 生物学通报, 1988(9): 16-18, 32.

Yang F Y. Recent research on oxidative phosphorylation mechanism [J]. Bulletin of Biology, 1988(9): 16-18, 32.

[22] Rato C, Monteiro D, Hepler P K, et al. Calmodulin activity and camp signaling modulate growth and apical secretion in pollen tubes [J]. Plant Journal, 2004(38): 887-897.

[23] Yang S. Comparative transcriptome analysis between cytoplasmic male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybean (*Glycine max* (L.) Merr) [J]. PLoS ONE, 2015(10): e0126771.