

## ‘无籽’瓯柑小孢子母细胞减数分裂特性基因 *RAD51* 和 *MS1* 的表达差异分析

朱咪咪<sup>1</sup>, 张 迟<sup>1,2</sup>, 常爱玲<sup>1</sup>, 党婉誉<sup>1</sup>, 周彩红<sup>1</sup>, 俞狄虎<sup>1</sup>, 吴莹莹<sup>1</sup>, 张 敏<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 临安 311300)

**摘要:** ‘无籽’瓯柑 *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ 是野生型瓯柑 *Citrus suavisissima* 的芽变, 其花粉完全败育, 败育起始于小孢子母细胞减数分裂形成四分体时期。研究 ‘无籽’ 瓯柑小孢子母细胞减数分裂异常的分子机制, 有利于深入认识果树芽变的发生机制。随机选择 “无籽” 瓯柑和瓯柑各 3 株, 根据花蕾直径采集花粉母细胞时期 (I), 四分体时期 (II), 单核花粉粒时期 (III), 双核花粉粒时期 (IV) 及花粉粒成熟期 (V) 共 5 个时期的花蕾并分离花药, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 分析减数分裂特性基因 *RAD51* 和 *MS1* 的相对表达量, 3 次重复。通过 SPSS 16.0 的最小显著差法 (LSD) 在 0.01 水平上进行各样品间的相对表达量差异分析。结果表明: *RAD51* 和 *MS1* 基因的表达高峰均集中在第 I 时期和第 II 时期, 且此时花药中的相对表达量均极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于花蕾。第 I 时期花药中, ‘无籽’ 瓯柑 *RAD51* 的相对表达量为瓯柑的 3.7 倍, *MS1* 可达 300 倍; 但同时期花蕾中, *RAD51* 的相对表达量仅 1.1 倍, *MS1* 为 140.0 倍。‘无籽’ 瓯柑 *RAD51* 基因在第 I 时期和第 II 时期的相对表达量极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于瓯柑, 说明 ‘无籽’ 瓯柑小孢子母细胞和四分体时期的细胞内均存在 DNA 受损现象; ‘无籽’ 瓯柑 *MS1* 基因在第 I 时期的相对表达量极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于瓯柑, 但第 II 时期极显著 ( $P < 0.01$ ) 低于瓯柑, 推测 ‘无籽’ 瓯柑败育花粉的形成与 *MS1* 基因表达紊乱引起油脂分泌、转运异常密切相关。图 6 表 1 参 24

**关键词:** 园艺学; ‘无籽’ 瓯柑; 减数分裂; 花蕾; 花药; *RAD51*; *MS1*; 实时荧光定量聚合酶链式反应

**中图分类号:** S666.1; S759.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2016)06-0921-07

## Expression of microsporocyte meiosis with special genes *RAD51* and *MS1* in *Citrus suavisissima* ‘Seedless’

ZHU Mimi<sup>1</sup>, ZHANG Chi<sup>1,2</sup>, CHANG Ailing<sup>1</sup>, DANG Wanyu<sup>1</sup>, ZHOU Caihong<sup>1</sup>, YU Dihui<sup>1</sup>,  
WU Yingying<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agriculture Products of Zhejiang Province, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** To obtain the relative expression of two meiosis special genes--*RAD51* and *MS1* (*Male Sterility1*), *Citrus suavisissima* ‘Seedless’, a bud variation of its wild type Ougan (*Citrus suavisissima*) with completely aborted pollens that appear abnormally from the tetrad stage, were studied through the molecular mechanism of abnormal meiosis. According to flower bud diameter, five stages of flower buds and anther--pre-meiotic (PM, I), tetrad (T, II), single-celled (SC, III), dual-core (DC, IV), and mature pollen (MP, V)--were collected and each was an composite sample from three trees. An experiment in real-time quantitative polymerase chain

收稿日期: 2015-12-19; 修回日期: 2016-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000897); 浙江省自然科学基金资助项目(Y3090494); 浙江省团队科技特派员服务计划项目(浙科发农[2013]215-122); 浙江省大学生科技创新活动计划项目(2016R412003)

作者简介: 朱咪咪, 从事经济林栽培与利用研究。E-mail: mmzjessica@163.com。通信作者: 张敏, 副教授, 博士, 从事经济林遗传育种研究。E-mail: mzhang@zafu.edu.cn

reaction (qRT-PCR) was conducted by three replications in each sample and the method of least significant difference (LSD) with SPSS 16.0 was used to test the expression differences between samples under the level of  $P < 0.01$ . Results showed that expression of *RAD51* at Stage I of the anther and the flower buds for *C. suavis* 'Seedless' was significantly higher ( $P < 0.01$ ) than Ougan. At Stage I of the anther, the relative expression of *RAD51* in *C. suavis* 'Seedless' was 3.7 times higher than in Ougan with *MS1* reaching about 300 times higher. However, at Stage I of the flower buds, *RAD51* was only 1.1 times higher and *MS1* was about 140 times higher. The significantly higher expression of *RAD51* at Stage I indicated that a phenomenon of DNA damage might exist in the microsporocyte and tetrad periods of *C. suavis* 'Seedless'; for gene *MS1*, significantly higher expression of *C. suavis* 'Seedless' for Stage I also meant that the aborted pollens of *C. suavis* 'Seedless' had a relationship with the abnormal secretion and transfer of oil lipids that were influenced by disordered expression of *MS1*. [Ch, 6 fig. 1 tab. 24 ref.]

**Key words:** horticulture; *Citrus suavis* 'Seedless'; meiosis; flower buds; anther; *RAD51*; *MS1*; qRT-PCR

减数分裂是植物生活史中的一个重要环节, 是有性生殖的前提, 是保持物种稳定性的基础<sup>[1]</sup>。本研究的实验材料‘无籽’瓯柑 *Citrus suavis* 'Seedless' 是 1996 年发现的一个瓯柑 *Citrus suavis* 的无核突变体, 具有果实完全无核的特性<sup>[2]</sup>。张迟等<sup>[3]</sup>采用半薄树脂切片、扫描电镜、透射电镜等方法对其花药发育过程和花粉形态进行观察, 发现在四分体时期出现异常, 在单核期出现明显异常, 认为花粉败育开始于小孢子母细胞减数分裂期至四分体时期。近年来, 模式植物减数分裂行为中的染色体配对和联会方面的研究取得了较大进展。PANOLI 等<sup>[4]</sup>研究了拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的直系同源基因 *Atspo11-1*, 染色体重组起始于 Spo11 调控的 DNA 双链解开, *Atspo11-1* 突变体中 *Atspo11-1* 的缺失会抑制染色体破碎化。LI 等<sup>[5]</sup>利用荧光原位杂交技术观察了拟南芥突变体 *rad51c-1* 的早期减数分裂行为, 发现该突变体的同源染色体无法正常配对并出现严重的破碎化现象。敲除 *RAD51C* 基因后得到的不育植株伴随有大孢子和花粉母细胞粗线期染色体异常<sup>[6]</sup>。ITO 等<sup>[7]</sup>研究了拟南芥中的 *MALE STERILITY1* (*MS1*) 基因, 它对减数分裂后的花粉发育很重要, 与花粉壁、花粉细胞质内容物和绒毡层发育有关。在果树方面, 目前的研究多采用分子标记法来发掘育性相关基因。如王跃进等<sup>[8]</sup>通过分离、提取和纯化经随机扩增多态 DNA (RAPD) 标记获得的特异片段, 根据其序列人工合成一条寡聚核苷酸作引物 (5'CCAGTTCGCC CGTAA ATG 3'), 在多个葡萄 *Vitis vinifera* 品系中进行验证, 凡出现约 590 bp 的 DNA 片段者即为葡萄无核基因携带者和无核性状表现者。杨英军等<sup>[9]</sup>又进一步根据此特异片段设计合成了 2 对引物, 开发出鉴别无核品种的 SCAR (特定序列扩增标记)。姚春潮等<sup>[10]</sup>利用 RAPD 技术对美味猕猴桃 *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* 海瓦德×秦雄 201 杂交 F1 代雌雄分离群体进行分析, 通过对 300 个随机引物的筛选和研究, 得到了与猕猴桃雄性基因连锁的 RAPD 标记 S1032-850。NWAFOR 等<sup>[11]</sup>采集了野生型葡萄和一个无核突变体材料的果实进行转录组测序技术 (RNA-Seq) 分析, 对得到的差异表达基因进行表达模式和功能富集分析, 发现花粉和胚囊两者的发育途径具有密切关联, 但无核性状具体由哪些基因控制仍不明。本研究根据‘无籽’瓯柑及其野生型小孢子母细胞时期花药转录组的测序结果, 选择了 *RAD51* 和 *MS1* 这 2 个减数分裂特性基因, 研究它们在‘无籽’瓯柑和瓯柑花粉发育不同时期的相对表达量差异, 来分析‘无籽’瓯柑小孢子母细胞减数分裂异常的分子机制。此外, 鉴于减数分裂只在特定时期和特定部位发生, 本研究选取了花蕾和花药 2 种材料进行基因相对表达量的测定, 进而分析不同材料所得结果的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料瓯柑和‘无籽’瓯柑采自丽水市林业科学研究院百果园。当花蕾刚露白时开始取样, 根据预备试验的结果, 采集‘无籽’瓯柑和瓯柑花粉母细胞形成期 (I), 四分体时期 (II), 单核花粉粒时期 (III), 双核花粉粒时期 (IV) 和花粉粒成熟期 (V) 共 5 个时期的花蕾和对应花药, 5 个时期的花蕾直径分别为 2.0~2.4 mm, 2.8~3.1 mm, 3.5~4.5 mm, 4.5~6.5 mm 和即将开放的花蕾 (6.5~7.1 mm, 图 1), 保存

于-70 ℃超低温冰箱。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 采用改良的 Trizol 法提取瓠柑和‘无籽’瓠柑各 5 个时期花蕾的 RNA，用 Aidlab 公司的‘EASYspin PLUS 植物 RNA 快速提取试剂盒’提取花药 RNA，10.0 g·kg<sup>-1</sup> 的琼脂糖凝胶对各样品的 RNA 进行电泳检测，再经 NanoDrop-1000 测吸光度值，检测样品 RNA 的质量。

1.2.2 荧光定量 PCR cDNA 的合成参照 TaKaRa 反转录试剂盒 PrimeScrip<sup>®</sup> RT reagent kit with gDNA Eraser (perfect real time) 的说明指南。根据转录组测序结果中的基因序列(已提交 GenBank)设计荧光定量特异引物(表 1)，以甜橙 *Citrus sinensis* 的 *Actin* 基因(*GU911361*)为内参，采用定量

仪器 CFX96 real-time system 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)和荧光染料 SYBR<sup>®</sup>Premix Ex *Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)进行实时表达量测定。反应程序为 95 ℃, 30 s; 95 ℃, 5 s; 57 ℃, 30 s, 39 个循环; 65~95 ℃, 隔 5 s 上升 0.5 ℃做融解曲线。设立重复 3 个·样品<sup>-1</sup>，根据 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法<sup>[12]</sup>进行基因相对表达量计算，利用 SPSS 16.0 的最小显著差(LSD)法在 0.01 水平上比较 2 个基因在不同组织和不同时期中的表达量差异。

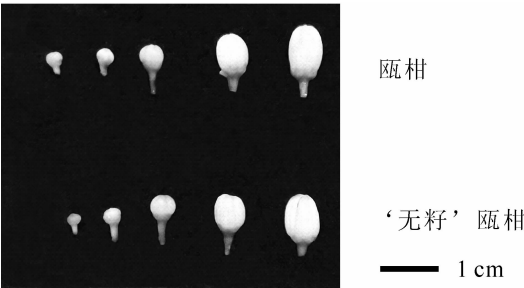


图 1 花粉发育 5 个时期的花蕾  
Figure1 Flower buds of five pollen developments

表 1 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)特异引物

Table 1 Specific primers for qRT-PCR			
基因	登录号	正向引物(5'→ 3')	反向引物(5'→ 3')
<i>RAD51</i>	KU204895	AGAAGCTGAAAGATGCGGGT	GATGGAGTTGGGTAGCACTGG
<i>MS1</i>	KU204897	AGTGCTTGCATTGATGATCC	TGAGGCATTTAGGCATAACG
内参 <i>Actin</i>	GU911361	ATCTGCTGGAAGCTGCTGAG	CCAAGCAGCATGAAGATCAA

2 结果与分析

2.1 *RAD51* 基因的时空定量表达

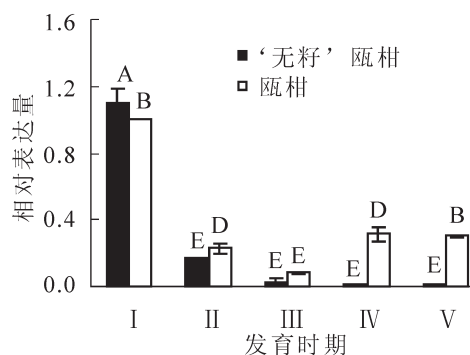
2.1.1 花蕾中 *RAD51* 基因的表达 以瓠柑第 I 时期花蕾的表达量为基准计算瓠柑和‘无籽’瓠柑各时期花蕾的 *RAD51* 的相对表达量。‘无籽’瓠柑和瓠柑花蕾中 *RAD51* 的表达主要集中在第 I 时期；‘无籽’瓠柑中 *RAD51* 基因的相对表达量逐渐下降，瓠柑先下降，在第Ⅳ时期和第Ⅴ时期略有上升(图2)。

2.1.2 花药中 *RAD51* 基因的表达 以瓠柑第 I 时期花药的表达量为基准计算瓠柑和‘无籽’瓠柑各时期花药的 *RAD51* 相对表达量。‘无籽’瓠柑和瓠柑花药中 *RAD51* 的表达主要集中在第 I 时期和第 II 时期，且此时‘无籽’瓠柑中的相对表达量均极显著( $P<0.01$ )高于瓠柑，第 I 时期达 3.7 倍左右；‘无籽’瓠柑中 *RAD51* 基因的相对表达量逐渐下降，瓠柑在第 II 时期最高，随后逐渐下降(图 3)。

2.2 *MS1* 基因的时空定量表达

2.2.1 花蕾中 *MS1* 基因的表达 以瓠柑第 I 时期花蕾的表达量为基准计算瓠柑和‘无籽’瓠柑各时期花蕾的 *MS1* 相对表达量。‘无籽’瓠柑和瓠柑花蕾中 *MS1* 的表达主要集中在第 I 时期和第 II 时期，且此时期存在极显著( $P<0.01$ )差异；第 I 时期‘无籽’瓠柑是瓠柑的 140.0 倍左右，但第 II 时期瓠柑是‘无籽’瓠柑的 2.5 倍；‘无籽’瓠柑中 *MS1* 基因的相对表达量逐渐下降，瓠柑在第 II 时期相对表达量最高，随后逐渐下降(图 4)。

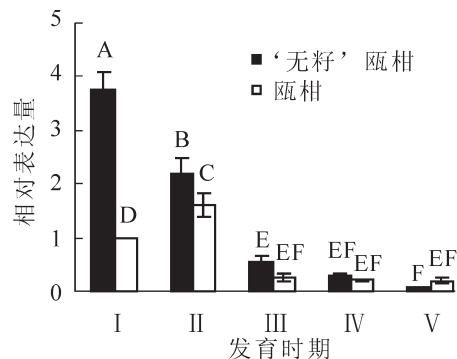
2.2.2 花药中 *MS1* 基因的表达 以瓠柑第 I 时期花药的表达量为基准计算瓠柑和‘无籽’瓠柑各时期花药的 *MS1* 相对表达量。‘无籽’瓠柑和瓠柑花药中 *MS1* 的表达也主要集中在第 I 时期和第 II 时期，且存在极显著( $P<0.01$ )差异；第 I 时期‘无籽’瓠柑是瓠柑的 300.0 倍左右，但第 II 时期瓠柑是‘无籽’瓠柑的 2.0 倍；‘无籽’瓠柑中 *MS1* 基因的相对表达量逐渐下降，瓠柑在第 II 时期相对表达量最高，随后逐渐下降(图 5)，此趋势与花蕾中相似(图 4)。



I~V 分别代表花粉母细胞形成期(I), 四分体时期(II), 单核花粉粒时期(III), 双核花粉粒时期(IV), 花粉粒成熟期(V)。不同字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 2 瓯柑和‘无籽’瓯柑花蕾 RAD51 的相对表达量

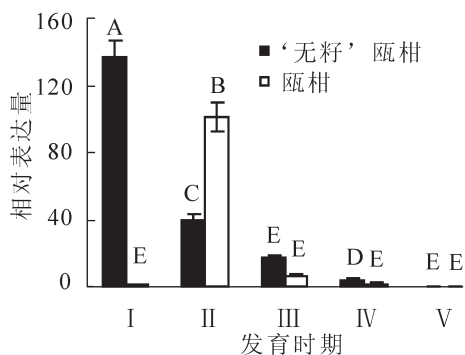
Figure 2 Expression alteration of RAD51 in flower bud of *Citrus suavisissima* and *Citrus suavisissima* ‘Seedless’



I~V 分别代表花粉母细胞形成期(I), 四分体时期(II), 单核花粉粒时期(III), 双核花粉粒时期(IV), 花粉粒成熟期(V)。不同字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 3 瓯柑和‘无籽’瓯柑花药 RAD51 的相对表达量

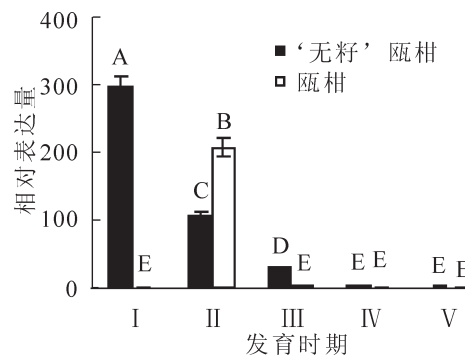
Figure 3 Expression alteration of RAD51 in anther of *Citrus suavisissima* and *Citrus suavisissima* ‘Seedless’



I~V 分别代表花粉母细胞形成期(I), 四分体时期(II), 单核花粉粒时期(III), 双核花粉粒时期(IV), 花粉粒成熟期(V)。不同字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 4 瓯柑和‘无籽’瓯柑花蕾 MS1 的相对表达量

Figure 4 Expression alteration of MS1 in flower bud of *Citrus suavisissima* and *Citrus suavisissima* ‘Seedless’



I~V 分别代表花粉母细胞形成期(I), 四分体时期(II), 单核花粉粒时期(III), 双核花粉粒时期(IV), 花粉粒成熟期(V)。不同字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 5 瓯柑和‘无籽’瓯柑花药 MS1 的相对表达量

Figure 5 Expression alteration of MS1 in anther of *Citrus suavisissima* and *Citrus suavisissima* ‘Seedless’

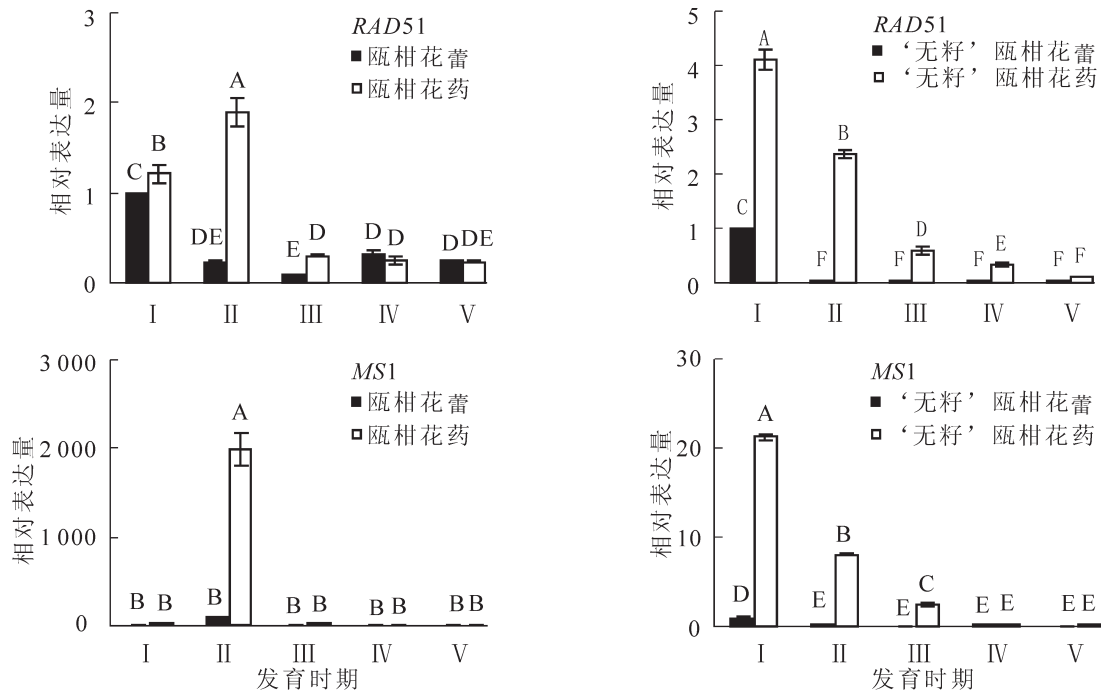
## 2.3 同种(品种)花蕾和花药之间基因表达量的比较分析

分别以‘无籽’瓯柑和瓯柑各自花蕾第 I 时期的表达量为基准计算同种(品种)花蕾和花药间的相对表达量, 比较同一基因在不同组织材料中的表达差异。除个别时期无极显著( $P < 0.01$ )差异外, 2 个种(品种)的其他时期均是花药中的相对表达量极显著( $P < 0.01$ )高于各自时期的花蕾(图 6)。

## 3 讨论

### 3.1 RAD51 的基因功能和表达分析

RAD51 的功能是修复 SPO11 引发产生的双链 DNA 分子断裂(double-strand breaks, DSBs)。RAD51 会附着到由蛋白复合体 MRX 产生的 3'单链末端上, 以促进单链 DNA 入侵到同源染色体双链中形成重组中间体, 在复合体解开的过程中形成染色体的交换(crossover, CO)和非交换(noncrossover, NCO)<sup>[13]</sup>。AtRAD51 基因单突变体雌、雄减数分裂过程均不正常, 单突变体植株不育, 减数分裂细胞中无法正常形成联会复合体且存在大量染色体碎片, 而 Atspo11-1Atrad51 双突变体中不存在染色体碎片, 说明 A-trad51 中的染色体碎片来自于 AtSPO11 引发的 DSBs<sup>[14]</sup>。动物 RAD51 基因是大肠埃希菌 *Escherichia coli* RecA 的同源基因, 与植物 RAD51 也具有一定同源性<sup>[15]</sup>, 在动物生命科学研究中发现 RAD51 蛋白在多



I~V 分别代表花粉母细胞形成期 (I), 四分体时期 (II), 单核花粉粒时期 (III), 双核花粉粒时期 (IV), 花粉粒成熟期 (V)。不同字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 6 同品种花蕾和花药间的相对表达量

Figure 6 Expression alteration of flower buds and anther from the same variety

种受损组织中表达增高, 认为这是 DNA 被损伤后细胞的一种反应<sup>[16-17]</sup>。

OSAKABE 等<sup>[18]</sup>对拟南芥进行不同强度的  $\gamma$  射线照射, 诱导产生 DSBs, 对不同器官内 *RAD51* 基因进行半定量 PCR 分析, 结果显示: 花芽中 *RAD51* 表达量最高, 且随照射强度增加而增高, 说明细胞内产生的 DSBs 越多, *RAD51* 基因越活跃。本研究中, ‘无籽’ 瓯柑第 I 时期和第 II 时期的花药中 *RAD51* 的相对表达量极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于瓯柑 (图 3), 表明 ‘无籽’ 瓯柑小孢子母细胞时期和四分体时期细胞内可能存在某种机制引起的 DNA 受损现象。

### 3.2 *MS1* 的基因功能和表达分析

*MS1* 基因编码一个含有植物同源域 (plant homeo domain, PHD) 指基序的转录因子, 参与绒毡层的发育和花粉壁的形成<sup>[19]</sup>。拟南芥 *ms1* 突变体花粉的透射电镜观察<sup>[20]</sup>显示, 前期突变体与野生型均能正常发育, 但从四分体解体开始, 突变体中的小孢子和绒毡层细胞的细胞质中出现颗粒状物质和非正常液泡, 小孢子内孢粉素分布及外壁柱状基粒棒的发育均异常, 并在随后的发育中被液泡充斥而萎缩退化。而 ‘无籽’ 瓯柑花药的绒毡层和花粉壁结构与瓯柑无明显差异, 但最终花粉粒形态出现明显差异, 瓯柑花粉粒饱满, ‘无籽’ 瓯柑的花粉粒大多干瘪、畸形且无内含物, 说明 *MS1* 在不同物种中的功能存在一定差异<sup>[3]</sup>。正常情况下, *MS1* 在小孢子母细胞减数分裂完成、单个小孢子从四分体分离时在绒毡层细胞中表达量较高<sup>[19]</sup>。本研究中, 瓯柑 *MS1* 的表达趋势符合此规律。拟南芥 *ms1-1* 突变体<sup>[21]</sup> *MS1* 的转录本在小孢子母细胞时期 (PMC) 到减数分裂期间表达量是野生型的 27.0 倍, 四分体到有丝分裂 I 时期表达量是野生型的 600.0 倍。本研究中 ‘无籽’ 瓯柑在小孢子母细胞时期 (第 I 时期) 的表达异常升高, 在花蕾中是瓯柑的 140.0 倍, 花药中更是高达 300.0 倍, 反而在四分体时期 (第 II 时期) 显著降低, 仅为瓯柑的 1/2。

YANG 等<sup>[21]</sup>利用花椰菜 *Brassica oleracea* var. *botrytis* 花叶病毒 35S 启动子 (CaMV35S) 使 *MS1* 基因过量表达, 得到一些花器官及花粉变异的拟南芥类型, 并对 *ms1* 变异花芽进行基因芯片分析, 其中 3 个有关油脂合成和花粉壁发育的基因 (*At5g07550*, *At5g07410* 和 *At5g07560*) 经 RT-PCR 验证, 发现在 *MS1* 过表达的拟南芥类型中均表现为下调表达, 推测 *ms1* 变异株中这些油脂蛋白的缺失影响了 TAGs 从内质网上的释放, 导致了油质的积累和不正常分泌。张敏等<sup>[22]</sup>通过 qRT-PCR 发现 ‘无籽’ 瓯柑中脂转移酶基因 (*CsLTP*) 和脂氧合酶基因 (*CsLOX*) 的相对表达量在花粉粒形成期显著下降, *LTP* 是 MYB99 的下游基

因, 而 MYB99 是受 *MS1* 调控的转录因子<sup>[7,21]</sup>, ‘无籽’瓠柑成熟花粉粒时期花药的绒毡层附近有大量的脂类物质残存<sup>[3]</sup>, 因此, ‘无籽’瓠柑败育花粉的形成与 *MS1* 基因过表达引起油脂分泌、转运异常密切相关。

### 3.3 不同组织材料的比较分析

本研究利用花蕾与花药 2 种组织材料对 *RAD51* 和 *MS1* 基因进行表达量比较, 发现同一基因在同一时期的花蕾和花药中相对表达量差异极显著 ( $P < 0.01$ ) (图 6)。任磊等<sup>[23]</sup>采用相对荧光定量的方法对 7 个花器官发育相关基因在牡丹 *Paeonia suffruticosa* 根、茎、叶、花瓣、萼片、雄蕊和心皮中的表达差异进行分析, 其中 *PsPI* 和 *PsMADS1* 主要在花瓣和雄蕊中表达, 其他器官几乎没有表达, 表明不同的基因在不同的器官中有不同的表达模式, 具有一定的组织特异性。本研究的重点是 ‘无籽’瓠柑减数分裂异常的分子机制, 因此, 采用花药作为研究材料可以更准确地反映减数分裂特性基因的表达水平。

## 4 结论与展望

在花粉母细胞形成期(Ⅰ), 四分体时期(Ⅱ), 单核花粉粒时期(Ⅲ), 双核花粉粒时期(Ⅳ), 花粉粒成熟期(Ⅴ)等 5 个时期的花蕾和花药中, 同种(品种)中各时期 *RAD51* 和 *MS1* 的表达量均是花药极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于花蕾。第Ⅰ时期花药中, ‘无籽’瓠柑 *RAD51* 的相对表达量为瓠柑的 3.7 倍, 说明 ‘无籽’瓠柑的小孢子母细胞时期和四分体时期可能存在某种机制引发的 DNA 受损现象, 从而引起 *RAD51* 的异常高量表达。第Ⅰ时期花药中 *MS1* 的表达量为瓠柑的 300.0 倍, 但第Ⅱ时期(四分体时期)锐减为瓠柑的 1/2; *MS1* 基因的提早过量表达可能引起油脂分泌、转运的异常, 与 ‘无籽’瓠柑败育花粉的形成密切相关。

CHEN 等<sup>[24]</sup>收集拟南芥性母细胞进行 RNA-Seq 测序, 结果显示: 减数分裂特性基因 *MND1*, *AtSPO11-2*, *AtSRP2*, *MSS* 等的表达量在性细胞中是花药中的 2.0 倍, *AtSPO11-1*, *AtDMC1*, *AtRAD51C*, *AtXRCC3* 等在性细胞和花药中表达量又比种子高, 说明基因表达量与组织特性密切相关。在后续的减数分裂分子机制研究中, 可尝试利用激光显微切割技术获取花药中的性母细胞进行转录组测序, 以获得更精确的基因信息, 推进 ‘无籽’瓠柑减数分裂异常的研究进程。

## 5 参考文献

- [1] 郑湘如, 王丽. 植物学[M]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 160 – 170.
- [2] 徐象华, 颜福花, 叶荣华, 等. 瓠柑研究进展[J]. 浙江林业科技, 2008, 28(3): 75 – 77.  
XU Xianghua, YAN Fuhua, YE Ronghua, et al. Advances in research of *Citrus reticulata* ‘Suavissima’ [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2008, 28(3): 75 – 77.
- [3] 张迟, 张敏, 朱铨, 等. 瓠柑及其无籽突变体花粉发育的细胞学观察[J]. 果树学报, 2014, 31(2): 265 – 269.  
ZHANG Chi, ZHANG Min, ZHU Quan, et al. Cytological observation of pollen development in ‘Ougan’ (*Citrus suavissima* Hort. ex Tanaka) and its seedless mutant [J]. *J Fruit Sci*, 2014, 31(2): 265 – 269.
- [4] PANOLI A P, RAVI M, SEBASTIAN J, et al. At mnd1 is required for homologous pairing during meiosis in *Arabidopsis* [J]. *Bmc Mol Biol*, 2006, 7(16): 20 – 34.
- [5] LI Wuxing, YANG Xiaohui, LIN Zhenguo, et al. The *atrad51c* gene is required for normal meiotic chromosome synapsis and double-stranded break repair in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(2): 965 – 976.
- [6] KOU Yanjun, CHANG Yuxiao, LI Xianghua, et al. The rice *RAD51C* gene is required for the meiosis of both female and male Gametocytes and the DNA repair of somatic cells [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(14): 5323 – 5335.
- [7] ITO T, NAGATA N, YOSHIBA Y, et al. *Arabidopsis* male sterility1 encodes a phd-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(11): 3549 – 3562.
- [8] 王跃进, OLUSOLA L. 检测普通无核基因 DNA 探针的合成与应用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(3): 42 – 46.  
WANG Yuejin, OLUSOLA L. Synthesis and application of DNA probe in the detection of seedless genes [J]. *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2002, 30(3): 42 – 46.
- [9] 杨英军, 王跃进, 周鹏, 等. 葡萄无核基因的 SCAR 标记及 Southern blot 分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自

- 然科学版, 2002, **30**(6): 77 – 80.
- YANG Yingjun, WANG Yuejin, ZHOU Peng, *et al.* SCAR marker linked to seedless genes in grapes and Southern blot analysis [J]. *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2002, **30**(6): 77 – 80.
- [10] 姚春潮, 王跃进, 刘旭峰, 等. 猕猴桃雄性基因 RAPD 标记 s1032-850 的获得及其应用[J]. 农业生物技术学报, 2005, **13**(5): 557 – 561.
- YAO Chunchao, WANG Yuejin, LIU Xufeng, *et al.* Obtainment and application of RAPD marker S1032-850 linked to male gene in *Actinidia* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2005, **13**(5): 557 – 561.
- [11] NWAFOR C C, GRIBAUDO I, SCHNEIDER A, *et al.* Transcriptome analysis during berry development provides insights into co-regulated and altered gene expression between a seeded wine grape variety and its seedless somatic variant [J]. *Bmc Genom*, 2014, **15**(1): 1030 – 1052.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 – 408.
- [13] ANDERSON L K, OFFENBERG H H, VERKUIJLEN W M, *et al.* RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1997, **94**(13): 6868 – 6873.
- [14] 张峰. 拟南芥减数分裂重组相关基因 *RAD51*, *PTD* 功能分析[D]. 上海: 上海师范大学, 2013.
- ZHANG Feng. *The Function Analysis of Meiosis Recombination Related Genes: PTD, Mus81 and Four of the RAD51 Gene Family Members RAD51 and PTD in Arabidopsis thaliana* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2013.
- [15] 袁瑛, 叶俊, 董琦, 等. DNA 修复基因 *Rad51* 表达调控区结构分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2004, **21**(3): 248 – 251.
- YUAN Ying, YE Jun, DONG Qi, *et al.* Structural characterization of 5'-flanking regulatory region of DNA repair gene *Rad51* [J]. *Chin J Med Genet*, 2004, **21**(3): 248 – 251.
- [16] MAACKER H, JOST K, OPITZ S, *et al.* DNA repair and recombination factor *Rad51* is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2000, **19**(23): 2791 – 2795.
- [17] MAACKER H, OPITZ S, JOST K, *et al.* Over-expression of wild-type *Rad51* correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2000, **88**(6): 907 – 913.
- [18] OSAKABE K, YOSHIOKA T, ICHIKAWA H, *et al.* Molecular cloning and characterization of *Rad51*-like genes from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **50**(1): 71 – 81.
- [19] WILSON Z A, MORROLL S M, DAWSON J, *et al.* The arabidopsis *MALE STERILITY1* (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors [J]. *Plant J*, 2001, **28**(1): 27 – 39.
- [20] VIZCAYBARRENA G, WILSON Z A. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis ms1* mutant [J]. *J Exp Bot*, 2006, **57**(11): 2709 – 2717.
- [21] YANG C, VIZCAY-BARRENA G, CONNER K, *et al.* *MALE STERILITY1* is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2007, **19**(11): 3530 – 3548.
- [22] 张敏, 刘志辉, 宋雪恩, 等. ‘无籽’ 瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 基因的克隆与表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2014, **31**(6): 823 – 830.
- ZHANG Min, LIU Zhihui, SONG Xueen, *et al.* Cloning and expression analysis of *CsLTP* and *CsLOX* in seedless Ougan (*Citrus suavisissima* ‘Seedless’) [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2014, **31**(6): 823 – 830.
- [23] 任磊. 牡丹花器官发育相关基因的克隆与表达[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011.
- REN Lei. *Cloning and Expression of Floral Organ Development Related Genes in Tree Peony* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2011.
- [24] CHEN Changbin, FARMER A D, LANGLEY R J, *et al.* Meiosis-specific gene discovery in plants: RNA-seq applied to isolated *Arabidopsis* male meiocytes [J]. *Bmc Plant Biol*, 2010, **10**(1): 242 – 247.