

‘无子瓯柑’ *CHS* 基因家族的克隆和表达分析

俞狄虎¹, 张 迟^{1,2}, 柯甫志³, 敬露阳¹, 顾雪娇², 吴宝玉⁴, 张 敏¹

(1. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 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 杭州 311300; 3. 浙江省柑橘研究所, 浙江 台州 318020; 4. 浙江省丽水市莲都区农业技术推广中心, 浙江 丽水 323000)

摘要: 为研究查尔酮合成酶基因(*CHS*)家族在‘无子瓯柑’ *Citrus suavissima* ‘Seedless’ 雄性不育发生过程中的作用, 以克里曼丁橘 *Citrus clementina* 基因组数据库为参照, 在‘无子瓯柑’和瓯柑 *Citrus suavissima* 的转录组和蛋白质组测序结果中筛选出4个 *CHS* 同源差异表达基因, 并对其克隆和表达量分析, 对克里曼丁橘 *CHS* 基因家族成员进行生物信息学分析。结果表明: ‘无子瓯柑’和瓯柑 *CHS* 基因编码区核苷酸序列相似度达98%以上。小孢子母细胞发育各时期 *CHS* 基因表达量在瓯柑和‘无子瓯柑’间差异显著。与瓯柑相比, ‘无子瓯柑’小孢子母细胞时期 *Ciclev10005133m*, *Ciclev10030093m* 和 *Ciclev10015535m* 的表达量显著下调; 减数分裂时期 *Ciclev10005133m*, *Ciclev10001405m* 和 *Ciclev10015535m* 的表达量显著下调; 四分体时期 *Ciclev10001405m* 和 *Ciclev10030093m* 的表达量显著减少。在花粉粒成熟时期的花蕾中, *Ciclev10001405m* 与 *Ciclev10005133m* 在花药中特异性表达。*CHS* 同源基因在花药不同时期中的差异表达可能是‘无子瓯柑’花药发育异常的重要原因, 并最终导致‘无子瓯柑’雄性不育。图3表6参15

关键词: 园艺学; 查尔酮合成酶; 雄性不育; ‘无子瓯柑’; 基因家族

中图分类号: S666.1; S759.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2019)05-0943-07

Cloning and expression analysis of *CHS* gene family in *Citrus suavissima* ‘Seedless’

YU Dihu¹, ZHANG Chi^{1,2}, KE Fuzhi³, JING Luyang¹, GU Xuejiao², WU Baoyu⁴, ZHANG Min¹

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Citrus Research Institute, Taizhou 318020, Zhejiang, China; 4. Zhejiang Lishui Liandu Agricultural Technology Extension Center, Lishui 323000, Zhejiang, China)

Abstract: *Citrus suavissima* ‘seedless’ (Wuzi Ougan), a bud variant of *C. suavissima* (Ougan), maintaining almost all excellent characteristics of ‘Ougan’ except for seedlessness, and chalcone synthase (*CHS*), playing an important role on plants by providing floral organs with different types of flavones, were used in this study. To indicate the role of the *CHS* gene family in male sterility in Wuzi Ougan, four *CHS* homologs were differentially expressed in a comparative analysis of transcriptome and proteome between Wuzi Ougan and Ougan. The *CHS* homologs in Wuzi Ougan and Ougan were isolated and their expressions were individually analyzed in different developmental stages of anthers and floral organs. Then, a bioinformatics analysis of the *CHS* gene family was carried out based on the clementine mandarin genome. Results showed that the nucleotide sequences of *CHS* homologs derived from Wuzi Ougan and Ougan shared more than 98% similarity with their ho-

收稿日期: 2018-09-10; 修回日期: 2019-01-23

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGN18C160005, LGN19C160005); 国家自然科学基金资助项目(31000897); 国家现代农业产业技术体系专项基金资助项目(CARS-27)

作者简介: 俞狄虎, 从事经济林栽培与利用研究。E-mail: 1175248409@qq.com。通信作者: 张敏, 副教授, 博士, 从事经济林栽培与利用研究。E-mail: mzhang@zafu.edu.cn

mologs in clementine mandarin. Real-time polymerase chain reaction (PCR) showed that *Ciclev10005133m*, *Ciclev10030093m*, and *Ciclev10015535m* were down-regulated at microsporocyte in Wuzi Ougan; whereas, *Ciclev10005133m*, *Ciclev10001405m*, and *Ciclev10015535m* were down-regulated in Wuzi Ougan at meiosis. In terms of tetrad, *Ciclev10030093m* and *Ciclev10001405m* were down-regulated in Wuzi Ougan ($P < 0.05$). After pollen maturation, *Ciclev10001405m* and *Ciclev10005133m* were mainly expressed at anthers ($P < 0.05$). The bioinformatics analysis revealed 13 *CHS* genes that were identified in clementine mandarin. In conclusion, members of the *CHS* family maintained high similarity in coding sequence (CDS) and were differentially expressed between Wuzi Ougan and Ougan in anther development, which was expected to contribute to male sterility in Wuzi Ougan. [Ch, 3 fig. 6 tab. 15 ref.]

Key words: horticulture; chalcone synthase (*CHS*); male sterility; *Citrus suavisissima* ‘Seedless’; gene family

雄性不育在开花植物中普遍存在,主要表现为雄蕊发育不正常,不能产生具有正常功能的花粉^[1]。‘无子瓯柑’*Citrus suavisissima* ‘Seedless’是瓯柑*Citrus suavisissima*的芽变品种,保留了瓯柑肉质饱满、香味特异、耐储藏的优良品质,因果实无核被人们青睐。研究认为,雄性不育是‘无子瓯柑’无核的重要原因之一^[2]。张迟等^[3]发现‘无子瓯柑’花粉败育始于小孢子母细胞时期,推测其雄性不育与能量代谢异常和营养物质缺乏有关。对矮牵牛*Petunia hybrid*^[4],枸杞*Lycium barbarum*^[5],辣椒*Capsicum annuum*^[6]和萝卜*Raphanus sativus*^[7]等植物的研究发现,查尔酮合成酶基因(*CHS*)的异常表达会引起雄性不育;*CHS*是黄酮类化合物代谢通路中的关键基因,通过影响查尔酮的产生从而影响黄酮类化合物的生物合成^[4],而黄酮类化合物的缺乏/过量是植物雄性不育的重要原因之一。有研究将克隆自10个柑橘种质的*CHS*基因与温州蜜柑‘国庆4号’*Citrus unshiu* ‘Guoqing 4’,柚‘冯威’*Citrus maxima* ‘Fengwei’和甜橙‘红宝石’*Citrus sinensis* ‘Ruby’的*CHS*比对,发现不同品种柑橘的*CHS*基因编码区核苷酸序列相似度极高,达98%以上^[8]。本研究以前期工作为基础,以克里曼丁橘*Citrus clementina*数据库为参照,对‘无子瓯柑’和瓯柑小孢子母细胞时期的花药进行转录组和蛋白质组测序,筛选*CHS*同源差异表达基因进行克隆和表达量分析,并对*CHS*基因家族进行生物信息学分析,以期为‘无子瓯柑’雄性不育机理的深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 数据源 ‘无子瓯柑’和瓯柑小孢子母细胞时期的花药转录组测序数据源自课题组上传的NCBI数据(NCBI登录号PRJNA430695)。

1.1.2 材料 ‘无子瓯柑’和瓯柑采自浙江省丽水市富岭街道南寨自然村,采样时间参照前期研究^[9]。采集‘无子瓯柑’和瓯柑成熟时期的花蕾进行基因克隆。采集两者小孢子母细胞时期(I,花蕾直径2.0~2.4 mm)、减数分裂时期(II,花蕾直径2.4~2.8 mm)和四分体时期(III,花蕾直径2.8~3.1 mm)的花药,用于分析不同发育时期的基因表达量。采集两者成熟花粉粒时期花蕾(花蕾直径6.5~6.9 mm)的4个不同部位(花药、花丝、雌蕊和花瓣),用于分析不同部位的基因表达量。所有材料均保存于-80℃。

1.2 基因克隆和基因表达量分析

利用RNA提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit, TaKaRa)提取瓯柑、‘无子瓯柑’不同发育时期的花药和成熟花粉粒时期花蕾不同部位的RNA,并对RNA样品质量进行检测。按反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa)说明书,将得到的RNA反转录成cDNA,并于-20℃保存。

以克里曼丁橘基因组数据库为参考,对小孢子母细胞时期‘无子瓯柑’和瓯柑的花药进行转录组和蛋白质组分析,鉴定得到*CHS*基因家族成员;以差异表达倍数(FC) > 1.2 ,错误发现率(FDR) < 0.01 为标准^[10],筛选到*CHS*同源差异表达基因;以差异表达倍数(FC) > 1.2 ,假设概率(P) < 0.05 为标准,筛选*CHS*同源差异表达蛋白。

对得到的差异表达*CHS*基因进行克隆及定量引物设计。对‘无子瓯柑’和瓯柑的*CHS*基因的蛋白

质编码区(CDS, Coding Sequence)进行克隆。聚合酶链式反应(PCR, Polymerase Chain Reaction)程序为 95 °C, 5 min; 95 °C, 30 s, 56 °C, 40 s, 38 个循环; 72 °C, 10 min。PCR 产物在质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳。利用胶回收试剂盒(TaKaRa)纯化胶回收产物并连接到 pMD-18 质粒(TaKaRa), 转化感受态大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α (TaKaRa)中, 37 °C 震荡培养后涂板挑菌。通过菌液 PCR 及电泳检测后, 选出条带大小正确的菌液送生工生物工程(上海)有限公司测序, 获得基因的核苷酸序列。

以克里曼丁橘序列为模板, 在线设计 qRT-PCR 特异性引物(<https://www.genscript.com>), 以甜橙 *Citrus sinensis* 的 *Actin* 基因(*GU911361*)^[9]为内参基因, 引物序列由生工生物工程(上海)有限公司合成。利用 CFX96 real-time system 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)及荧光染料 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa)说明书进行实时定量 PCR, 反应程序为 95 °C, 30 s, 95 °C, 5 s, 57 °C, 30 s, 39 个循环, 65~95 °C 升温检测扩增产物的溶解曲线^[9]。设置 3 个重复, 根据 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法, 以瓯柑小孢子母细胞时期花药的表达量为基准计算基因相对表达量^[11], 比较 ‘无子瓯柑’ 和瓯柑在花药不同发育时期和花粉粒成熟期花蕾不同部位的基因表达量。

1.3 *CHS* 基因家族生物信息学分析

柑橘 *CHS* 基因编码区核苷酸序列相似度极高^[8], 因此以克里曼丁橘为例开展 *CHS* 基因及蛋白质的生物信息学分析。登录克里曼丁橘数据库, 下载 *CHS* 基因全长序列、基因 CDS 序列、家族蛋白序列等信息。所有蛋白质序列通过在线数据库 ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam>)进行蛋白生化分析。基于已有报道^[12], 利用 CELLOv2.5 进行亚细胞定位。通过在线数据库 Prabi(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)进行蛋白二级结构分析。利用 MEGA6.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建克里曼丁橘(https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Celemantina)、甜橙(https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Csinensis)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Athaliana)和水稻 *Oryza sativa* (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Osatava)的 *CHS* 同源蛋白系统进化树, 设置 Bootstrap 值为 1 000, 去除支持率低于 50%的节点, 并显示各分支长度。

2 结果与分析

2.1 *CHS* 基因家族成员的鉴定和克隆

对小孢子母细胞时期的 ‘无子瓯柑’ 和瓯柑花药转录组和蛋白质组数据分析, 共得到 10 个 *CHS* 同源基因(表 1); 转录组测序结果满足差异表达倍数 >1.2 且错误发现率 <0.01 的有 3 个基因(*Ciclev10005133m*, *Ciclev10001405m*, *Ciclev10030093m*), 蛋白质组测序结果满足差异表达倍数 >1.2 且假设概率 <0.05 标准的有 1 个基因(*Ciclev10015535m*)。得到的 4 个差异表达 *CHS* 基因引物序列如表 2。

表 1 ‘无子瓯柑’ *CHS* 基因家族成员及其小孢子母细胞时期相对表达量

Table 1 *CHS* gene family and expression in *C. suavis* ‘Seedless’ at microsporocyte

基因名称	差异表达倍数	错误发现率/假设概率	基因名称	差异表达倍数	错误发现率/假设概率
<i>Ciclev10015535m</i>	0.76	0.004 6 ^b	<i>Ciclev10028604m</i>	5.50	0.161 3 ^a
<i>Ciclev10005133m</i>	0.65	0.007 5 ^a	<i>Ciclev10030093m</i>	0.71	0.007 9 ^a
<i>Ciclev10001405m</i>	1.32	0.006 3 ^a	<i>Ciclev10028605m</i>	0.91	0.144 1 ^a
<i>Ciclev10001413m</i>	5.50	0.595 4 ^a	<i>Ciclev10030398m</i>	5.50	0.399 2 ^a
<i>Ciclev10001395m</i>	0.94	0.717 6 ^a	<i>Ciclev10001905m</i>	0.90	0.064 2 ^a

说明: a 表示错误发现率; b 表示假设概率

表 2 基因克隆引物

Table 2 Sequences of primer for gene cloning

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>Ciclev10005133m</i>	ATGGTGACCGTCGATGAAG	CAGTGTGCCCGCTGCTTAA
<i>Ciclev10001405m</i>	ATGGAGAAAGTTAAAGATG	TCCCTACTGTTACAACCTAG
<i>Ciclev10030093m</i>	ATGACGACAGTGAAGTAA	ACAAATTCACCAACTACTGA
<i>Ciclev10015535m</i>	ATGGCAACCGTTCAAGAGAT	GTGTCCCATCAAAGCTTGA

qRT-PCR 特异性引物序列如表 3。

表 3 qRT-PCR 引物

Table 3 Sequences of primer for real-time PCR

基因 ID	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
GU911361	ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG	CCAAGCAGCATGAAGATCAA
<i>Ciclev10015535m</i>	AAGAGCGAGCATATGACGGA	CAGCTTCTTTCCCGAGCTTC
<i>Ciclev10001405m</i>	AATTGTGTCCGGTGCACAAA	ATCCGGAACGGACTAAACGC
<i>Ciclev10005133m</i>	AGCCGAGAACAACAAAGG	ATGGGCTTCTCGATCTCAGG
<i>Ciclev10030093m</i>	CAAGGACCAACAGCAACGAT	CTTTCAGCTCGGTCTTGTGG

对克隆得到的‘无子瓯柑’和瓯柑的 *CHS* 同源基因序列(*CsCHS*)进行比对, 结果发现: *Ciclev10015535m*, *Ciclev10005133m* 和 *Ciclev10030093m* 在瓯柑和‘无子瓯柑’间存在核苷酸序列变异, 但仅 *Ciclev10030093m* 在编码氨基酸水平发生了改变(表 4)。

表 4 瓯柑和‘无子瓯柑’的 *CHS* 同源基因

Table 4 Alignments of *CsCHS* nucleotide sequences between *Citrus suawissima* ‘Seedless’ and *C. suawissima*

基因名称	瓯柑		‘无子瓯柑’		开放阅读框长度/bp	同源基因在瓯柑与‘无子瓯柑’间的相似度/%	差异碱基位/bp	氨基酸的变化
	命名	GenBank 登录号	命名	GenBank 登录号				
<i>Ciclev10015535m</i>	<i>CsCHS1</i>	MK070533	<i>CsCHS5</i>	MK070537	1 176	99	501	无
<i>Ciclev10001405m</i>	<i>CsCHS6</i>	MK070536	<i>CsCHS6</i>	MK070536	1 188	100	无	无
<i>Ciclev10005133m</i>	<i>CsCHS3</i>	MK070534	<i>CsCHS7</i>	MK070538	1 173	98	549~954	922 bp 处苏氨酸突变为丙氨酸
<i>Ciclev10030093m</i>	<i>CsCHS4</i>	MK070535	<i>CsCHS8</i>	MK070539	1 179	98	342, 495	无

2.2 *CHS* 基因家族成员的表达分析

图 1 表明: 小孢子母细胞时期, ‘无子瓯柑’与瓯柑相比 *Ciclev10005133m*, *Ciclev10030093m* 和 *Ciclev10015535m* 显著下调, *Ciclev10001405m* 显著上调; 减数分裂时期, *Ciclev10005133m*, *Ciclev10001405m* 和 *Ciclev10015535m* 显著下调; 四分体时期, *Ciclev10001405m* 和 *Ciclev10030093m* 显著下调, *Ciclev10005133m* 显著上调。

由图 2 可知: 成熟花粉粒时期, ‘无子瓯柑’和瓯柑的花丝中 *CHS* 基因表达量相仿。花药中 *Ciclev10001405m* 和 *Ciclev10005133m* 表达量显著高于其他花器官; *Ciclev10030093m*, *Ciclev10005133m* 和 *Ciclev10015535m* 的表达在‘无子瓯柑’和瓯柑的花药中存在显著差异, 可能会引起该时期‘无子瓯柑’

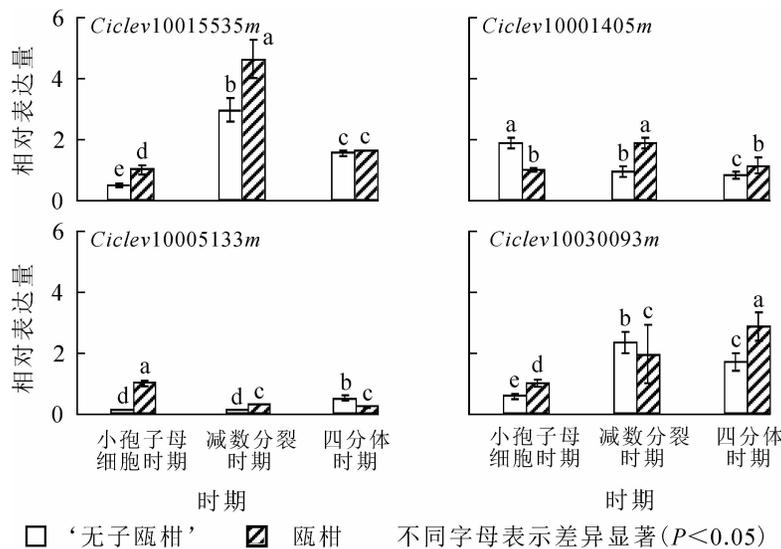


图 1 ‘无子瓯柑’和瓯柑 *CHS* 基因在花药发育过程中的基因表达分析

Figure 1 Expression level of anther in different development stages in *C. suawissima* ‘Seedless’ and *C. suawissima*

和瓯柑的花药中黄酮含量的差异。总的来说，花药中 *Ciclev10001405m* 表达量远高于花瓣、雌蕊和花丝，推测 *Ciclev10001405m* 的表达在花药中具有特异性。

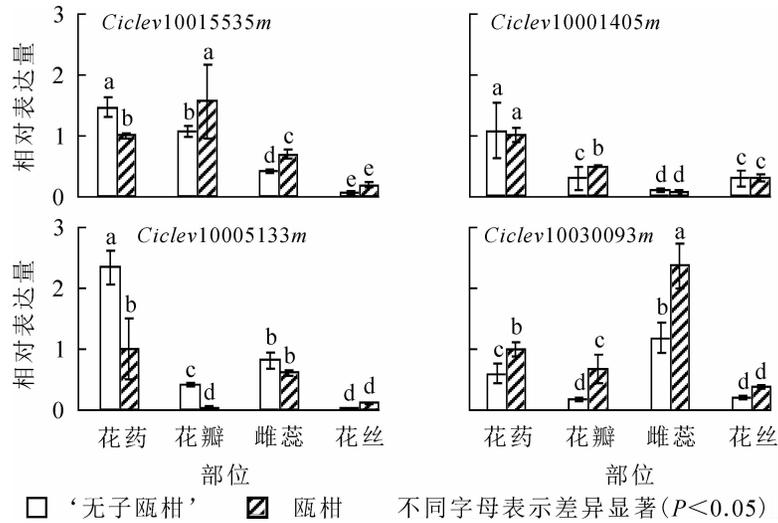


图 2 ‘无子瓯柑’和瓯柑花蕾不同部位的 *CHS* 基因的相对表达量

Figure 2 Expression of *CHS* genes among different floral organs in *C. suavis* ‘seedless’ and *C. suavis*

2.3 *CHS* 基因家族的生物信息学分析

2.3.1 *CHS* 基因家族成员鉴定 克里曼丁橘基因组数据库共鉴定到 13 个 *CHS* 基因家族成员。对 *CHS* 蛋白质理化性质的分析表明：编码的氨基酸数量最少的是 *Ciclev10003127m* (309 个)，最多的是 *Ciclev10001395m* (396 个)；平均等电点为 6.12，所有蛋白质均为酸性蛋白。相比之下，‘无子瓯柑’和瓯柑中，*Ciclev10005133m* (390 个) 编码的氨基酸数量最少，*Ciclev10001405m* (395 个) 编码的氨基酸数量最多；平均等电点为 6.27 (表 5)。亚细胞定位结果表明：这些 *CHS* 蛋白都分布在细胞质中，说明 *CHS* 蛋白在细胞中的分布具有特异性。蛋白质二级结构分析表明： α -螺旋比例和数量均最高， β -转角则相对较少；表现为 α -螺旋数量 > 无规则卷曲数量 > 延伸链数量 > β -转角数量。‘无子瓯柑’与瓯柑中筛选的 4 个 *CHS* 蛋白也表现出相似趋势 (表 6)，推测 α -螺旋在蛋白质二级结构中起主导作用。

表 5 *CHS* 基因及其表达

Table 5 Basic information of *CHS* genes and proteins

基因名称	氨基酸数量/个	分子量/Da	等电点	基因名称	氨基酸数量/个	分子量/Da	等电点
<i>Ciclev10015535m</i>	391	42 592.17	6.47	<i>Ciclev10030093m</i>	392	43 406.82	5.82
<i>Ciclev10005133m</i>	390	42 676.30	5.84	<i>Ciclev10028605m</i>	395	43 436.08	6.17
<i>Ciclev10015900m</i>	328	35 477.11	6.11	<i>Ciclev10030398m</i>	390	429 51.35	6.10
<i>Ciclev10001405m</i>	395	42 918.26	6.95	<i>Ciclev10001905m</i>	312	33 958.16	5.44
<i>Ciclev10001413m</i>	394	43 364.92	6.56	<i>Ciclev10001806m</i>	330	36 069.43	6.33
<i>Ciclev10001395m</i>	396	43 377.16	6.77	<i>Ciclev10003127m</i>	309	33 988.20	5.59
<i>Ciclev10028604m</i>	395	43 383.97	5.48				

2.3.2 *CHS* 家族同源蛋白系统进化树构建 现有研究筛选到克里曼丁橘 13 个 *CHS* 蛋白、甜橙 7 个 *CHS* 蛋白、拟南芥 4 个 *CHS* 蛋白和水稻 3 个 *CHS* 蛋白。按照遗传距离可以将 *CHS* 蛋白聚类为 5 个亚家族 (图 3)。Group I 包含 3 个拟南芥 *CHS* 蛋白和 2 个水稻 *CHS* 蛋白。Group II 包含 5 个克里曼丁橘 *CHS* 蛋白和 3 个甜橙 *CHS* 蛋白。Group III 包含 2 个克里曼丁橘 *CHS* 蛋白。Group IV 包含 3 个克里曼丁橘 *CHS* 蛋白和 3 个甜橙 *CHS* 蛋白。Group V 包含上述 4 个物种的 *CHS* 蛋白成员。其中 *Ciclev10005133m* 蛋白和 *Ciclev10015535m* 蛋白均聚类于 Group V，*Ciclev10030093m* 蛋白和 *Ciclev10001405m* 蛋白则分别聚类于 Group II 和 Group IV。

本研究以克里曼丁橘数据库为基础,从‘无子瓯柑’和瓯柑的转录组和蛋白质组数据中筛选出 4 个 *CHS* 同源差异表达基因,其核苷酸序列在‘无子瓯柑’和瓯柑中的相似度达到 98%,并且 3 个同源基因在‘无子瓯柑’中表达的显著下调起始于小孢子母细胞时期。*CHS* 的异常表达可能是‘无子瓯柑’小孢子发育异常而造成雄性不育的原因。

4 参考文献

- [1] 曹庆芹, 伊华林, 邓秀新. 果树雄性不育研究进展[J]. 果树学报, 2005, **22**(6): 678 – 681.
CAO Qingqin, YI Hualin, DENG Xiuxin. Advances in research on male sterility in fruit crops [J]. *J Fruit Sci*, 2005, **22**(6): 678 – 681.
- [2] HU Zhiyong, ZHANG Min, WEN Qigen, *et al.* Abnormal microspore development leads to pollen abortion in a seedless mutant of ‘Ougan’ mandarin (*Citrus suavisissima* Hort. ex Tanaka) [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2007, **132**(6): 777 – 782.
- [3] 张迟, 张敏, 朱铨, 等. ‘瓯柑’及其无子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 suavisissima* Hort. ex Tanaka) and its seedless mutant [J]. *J Fruit Sci*, 2014, **31**(2): 265 – 269.
- [4] NAPOLI C A, FAHY D, WANG Huayu, *et al.* White anther: a petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene [J]. *Plant Physiol*, 1999, **120**(2): 615 – 622.
- [5] ZHENG Rui, YUE Sijun, XU Xiaoyan, *et al.* Proteome analysis of the wild and YX-1 male sterile mutant anthers of wolfberry (*Lycium barbarum* L.) [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(7): e41861.
- [6] 陈遥, 彭彦, 刘峰, 等. 辣椒 *CHS* 基因表达的定量分析及与雄性不育的相关性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2013, **39**(3): 259 – 264.
CHEN Yao, PENG Yan, LIU Feng, *et al.* The quantitative analysis of *CHS* in *Capsicum annuum* L. and its correlation to male sterility [J]. *J Hunan Agric Univ Nat Sci*, 2013, **39**(3): 259 – 264.
- [7] XIE Yang, ZHANG Wei, WANG Yan, *et al.* Comprehensive transcriptome-based characterization of differentially expressed genes involved in microsporogenesis of radish CMS line and its maintainer [J]. *Funct Integr Genomic*, 2016, **16**(5): 529 – 543.
- [8] 王志彬, 申晚霞, 朱世平, 等. 柑橘 *CHS* 基因序列多态性及表达水平对类黄酮生物合成的影响[J]. 园艺学报, 2015, **42**(3): 435 – 444.
WANG Zhibin, SHEN Wanxia, ZHU Shiping, *et al.* Polymorphism and expression of chalcone synthase gene in citrus related to the flavonoids content [J]. *Acta Horti sin*, 2015, **42**(3): 435 – 444.
- [9] 朱咪咪, 张迟, 常爱玲, 等. ‘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[J]. 浙江农林大学学报, 2016, **33**(6): 921 – 927.
ZHU Mimi, ZHANG Chi, CHANG Ailing, *et al.* Expression of microsporocyte meiosis with special genes *RAD51* and *MS1* in *Citrus suavisissima* ‘seedless’ [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, **33**(6): 921 – 927.
- [10] QIU Lingling, JIANG Bo, FANG Jia, *et al.* Analysis of transcriptome in hickory (*Carya cathayensis*), and uncover the dynamics in the hormonal signaling pathway during graft process [J]. *BMC Genomics*, 2017, **17**(1): 935.
- [11] 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.
- [12] YU Chinsheng, LIN Chinjen, HWANG Jennkang. Predicting subcellular localization of proteins for gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions [J]. *Protein Sci*, 2004, **13**(5): 1402 – 1406.
- [13] ZHANG Yi, QU Lijia, LIU Meihua, *et al.* Structural and expressional analysis of a cDNA that expresses predominantly in rice stamens [J]. *Chin Sci Bull*, 1998, **43**(9): 765 – 769.
- [14] AKADA S, DUBE S K. Organization of soybean chalcone synthase gene clusters and characterization of a new member of the family [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, **29**(2): 189 – 199.
- [15] ZHENG Honghong, QU Lijia, LIU Meijia, *et al.* An anther-specific chalcone synthase-like gene D5 related to rice pollen development [J]. *Chin Sci Bull*, 2000, **45**(21): 1921 – 1926.