

miRNA在沙田柚配子体自交不亲和反应中的差异表达与功能分析

郭丹妮, 刘玉洁, 刘华英, 李惠敏, 秦新民*

广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林
Email: *xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn

收稿日期: 2020年11月23日; 录用日期: 2020年12月31日; 发布日期: 2021年1月7日

摘要

以沙田柚自交1~3 d以及异交1~3 d花柱为实验材料, 构建小RNA测序文库。利用HiSeq深度测序对Small RNA进行测序, 然后对差异表达miRNA进行分类注释和靶基因预测, 并对靶基因进行GO功能注释以及KEGG pathway注释。结果表明自交1~3 d花柱中已知miRNA的个数分别为178、179和186个, 而新miRNA分别为640、739和801个。异交1~3 d花柱中的已知miRNA的个数分别为232、122和219个, 新miRNA分别为1184、476和836个。在YJ1/ZJ1、YJ2/ZJ2、YJ3/ZJ3的比中共获得了16个差异表达的已知miRNA以及23个差异表达的新miRNA。差异表达miRNA靶基因的GO功能显著性富集分析结果表明, 这些miRNA靶基因的功能涉及到RNA降解、转录因子、植物激素、植物与病原菌相互作用、结合功能、激酶等代谢过程。通过本研究, 挖掘出了一些与沙田柚自交不亲和相关的miRNA, 可为今后阐明沙田柚配子体自交不亲和的分子机理提供依据。

关键词

沙田柚, 配子体自交不亲和, 花柱, miRNA, 差异表达

Differential Expression and Functional Analysis of miRNA in Self-Incompatibility Reaction of Gametophytes of *Citrus Citrus grandis* var. *Shatinyu* Hort

Danni Guo, Yujie Liu, Huaying Liu, Huimin Li, Xinmin Qin*

College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin Guangxi
Email: *xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn

Received: Nov. 23rd, 2020; accepted: Dec. 31st, 2020; published: Jan. 7th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 郭丹妮, 刘玉洁, 刘华英, 李惠敏, 秦新民. miRNA在沙田柚配子体自交不亲和反应中的差异表达与功能分析[J]. 植物学研究, 2021, 10(1): 10-18. DOI: 10.12677/br.2021.101003

Abstract

This study aimed to understand the self-incompatibility mechanism in *Citrus grandis* var. *Shatinyu*. The one day, two days and three days styles of Shatinyu after self-pollination and cross-pollination were used to construct small RNA libraries and the all Small RNA were sequenced by high-throughput sequencing technique. Then, the differentially expressed miRNAs were classified and predicted, and the target genes were annotated and the KEGG pathway was used to investigate the effect of miRNA on the self-incompatibility of *Citrus grandis* var. *Shatinyu*. The results showed that there were 178, 179 and 186 known miRNA and 640, 739 and 801 novel miRNA in the 1~3 d self-pollination style, respectively. There were 232, 122 and 219 known miRNA and 1184, 476 and 836 novel miRNA in the 1~3 d cross-pollination style, respectively. Moreover, statistics of differentially expressed miRNA showed that there were 16 differentially expressed known miRNA and 23 differentially expressed novel miRNA coexisted in ZJ1/YJ1, ZJ2/YJ2 and ZJ3/YJ3. Gene Ontology enrichment analysis showed that the function of differentially expressed miRNA target gene was mainly involved in responding to RNA degradation, transcription factors, plant hormones, plant-pathogen interaction, binding function, kinase and other metabolic processes. In sum, through this study, some miRNAs associated with self-incompatibility in Shatinyu were discovered. These results will provide a theoretical reference for further exploration of self-incompatibility molecular mechanism in *Citrus grandis* var. *Shatinyu*.

Keywords

Citrus grandis var. *Shatinyu* Hort, Gametophytic Self-Incompatibility, Styles, miRNA, Differential Expression

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

自交不亲和(self-incompatibility, SI)是植物经过长期自然进化形成一种特殊的生殖隔离机制,这种现象对于维持物种的遗传多样性有着重要作用[1]。目前,人们发现在蔷薇科、茄科、玄参科、罂粟科和十字花科等 80 多个科的 3000 多种植物中广泛存在着自交不亲和现象,并对其进行了相关研究[2] [3] [4] [5] [6]。

沙田柚属芸香科柑橘属果树,为高度自交不亲和。薛妙男等[7] [8]、杨继华等[9] [10]、秦新民等[11] [12] [13]对沙田柚自交不亲和的细胞学、蛋白质化学,以及相关基因进行了相关研究,证实了沙田柚的自交不亲和属于配子体自交不亲和类型,发现了自交花柱中一些蛋白参与了自交不亲和过程,并对一些相关基因进行了克隆和功能验证。

MicroRNA (miRNA)为基因组中一类内源性的非编码 RNA 片段,长度约为 19~24 nt。对植物的生长发育、代谢、信号转导、胁迫应答等生理过程有重要的调节功能[14] [15] [16] [17]。但目前植物自交不亲和研究中尚未见涉及 miRNA 的研究报道。本研究以自交和异交 1、2、3 天花柱为材料,构建小 RNA 测序文库,进行 miRNA 测序和分类注释,对差异表达的 miRNA 进行靶基因预测,并对靶基因所在的 GO 功能注释以及 KEGG pathway 注释,探讨 miRNA 在沙田柚自交不亲和中的作用。

2. 材料与方法

2.1. 材料处理与收集

实验材料为沙田柚(*Citrus grandis* var. *Shatianyu* Hort)花柱。在沙田柚的盛花期(4月中旬)分别对沙田柚样树进行人工自花授粉(沙田柚×沙田柚)和异花授粉(酸柚×沙田柚),然后分别采集自交 1~3 d (标记为 ZJ1、ZJ3、ZJ3)和异交授粉 1~3 d (标记为 YJ1、YJ2、YJ3)后的花柱,立即放入液氮,保存于-80℃超低温冰箱中备用。

2.2. 总 RNA 的提取及文库构建

总 RNA 的提取采用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司)并参照其操作手册进行。建库与测序由华大科技有限公司进行。

2.3. 花柱中 miRNA 的鉴定

将获得的 sRNA 经过 blast 或者 bowtie 比对到 miRBase 数据库,鉴定得到已知的 miRNA。新 miRNA 采用华大自主开发的 Mireap 软件进行预测。

2.4. miRNA 靶基因的预测、GO 功能注释及 KEGG 代谢通路分析

采用 psRobt 和 TargetFinder 软件进行 miRNA 靶基因的预测。靶基因进行 GO 功能富集显著性分析与 KEGG 代谢通路富集性分析分别采用 GO 数据库(<http://www.Geneontology.org>)和 KOBAS (2.0)软件进行。

3. 结果

3.1. 测序数据统计

文库测序获得的 Raw Data 经过去除低质量的序列、3'端接头、5'端接头污染物、polyA,以及小于 18 nt 序列等,6 个样品获得的 clean reads 分别为:23046850 (YJ1)、12556786 (YJ2)、23949192 (YJ3)、20472150 (ZJ1)、18567950 (ZJ2)、22197840 (ZJ3)。通过对 6 个样品的 sRNA 进行了长度统计,大多数已知功能的 sRNA 的长度介于 20~24 nt,6 个样品的 sRNA 长度分配模式一致,21 nt 的 sRNA 的丰度最高,占 clean reads 的比例都在 47.75%以上,接着是 24 nt、22 nt 和 23 nt,符合植物 sRNA 的长度分配。

3.2. sRNA 分类注释

在所有注释信息中,可能存在一个 sRNA 同时比对上两种不同注释信息的情况。为了保证每个 unique sRNA 只有一个注释,根据 rRNAetc > known miRNA > piRNA > repeat > exon > intron 的优先顺序将 sRNA 进行比对[18],没有比对上任何注释信息的 sRNA 用 unann 来表示。本实验 6 个样品的 sRNA 的分类注释信息见表 1。

Table 1. Annotation of sRNA classification

表 1. sRNA 分类注释

	YJ1	YJ2	YJ3	ZJ1	ZJ2	ZJ3
Total reads	23,674,636	14,465,682	24,805,180	21,113,205	19,050,972	22,881,662
Intron_antisense	131,674	48,028	109,090	106,744	83,648	101,808
Intron_sense	233,195	86,556	213,500	190,080	146,821	183,147
snRNA	176,025	56,293	173,644	205,567	283,041	271,680

Continued

Exon_sense	460,594	218,320	509,796	369,665	313,847	415,809
piRNA	48	14	71	11	36	22
unann	9,094,074	4,637,853	8,450,224	7,412,571	6,682,942	8,169,189
rRNA	4,431,366	3,514,466	7,630,749	4,151,611	3,477,815	5,658,974
snoRNA	26,485	17,699	52,689	15,361	21,136	28,442
Exon_antisense	449,479	192,013	421,629	372,045	303,387	365,746
miRNA	7,790,619	3,566,187	5,959,941	7,499,949	7,112,740	6,724,324
tRNA	253,291	219,357	427,859	148,546	142,537	278,699

3.3. 已知 miRNA 的家族分析

将 6 个样品所获得的 sRNA 通过 blast 或 bowtie 比对到 miRBase 数据库(<http://www.mirbase.org/>), 获得已知 miRNA 及所属家族。结果表明 6 个样品中已知的 miRNA 属于 27 个家族和一个尚未定义的家族, 结果与甜橙所含有的 miRNA 家族一致。

3.4. 新 miRNA 的预测

对未注释上任何 RNA 但比对上基因组外显子反义链、内含子以及基因间的 sRNAs, 利用生物信息学分析软件 Mireap 或 mirdeep 对其进行分析。经过比对注释, 在 YJ1、YJ2、YJ3、ZJ1、ZJ2、ZJ3 中分别鉴定出 1184、476、836、640、739 和 801 个新 miRNA。

3.5. 自交与异交花柱间差异表达的已知 miRNA 和新 miRNA 分析

分别比较 YJ1/ZJ1、YJ2/ZJ2、YJ3/ZJ3 归一化表达水平的 miRNA, 以 log₂ 绝对值大于 1 为筛选条件, 寻找差异表达 miRNA。结果在 YJ1/ZJ1、YJ2/ZJ2、YJ3/ZJ3 的比对其获得了 16 个差异表达的已知 miRNA 以及 23 个差异表达的新 miRNA (表 2)。

Table 2. Differential expression miRNA between cross-pollinated and self-pollinated styles

表 2. 异交/自交花柱差异表达 miRNA

基因号	序列	Fc (YJ1/ZJ1)	Fc (YJ2/ZJ2)	Fc (YJ3/ZJ3)
novel_mir_220	CCACCGTTGTATTGTATGAGA	1.80	-5.39	3.91
novel_mir_152	TTGGCCCTGTAGAATTAGAATT	-4.24	-3.97	-5.11
novel_mir_1801	AGAGAAACAAGGAAAGTAGAATT	-5.14	-4.89	4.40
miR9479-3p	AGAGAATGGTCAGAGGTGTCGGA	-5.22	-6.642	-7.26
novel_mir_83	GAGAACCTTGACTTAGACTCTT	-5.41	4.00	-6.27
miR5139	AACCTGGCTCTGATACCA	1.07	1.37	1.33
novel_mir_103	CTAGCTGCTGTAACCTAGAACT	4.85	-4.39	4.84
novel_mir_122	ATTTACTGACACACTTTGACAG	3.93	-4.50	-4.73
novel_mir_14	TGACTCGTGAGTTGGCCTTG	-13.68	-12.87	-13.91
miR6171	TTGTGAGAATCTGAAGGCTTT	-6.70	-5.54	1.40
novel_mir_125	CAAAGCTGTAGAACTTGGCATC	6.57	-1.30	-6.99
miR419	TTGATGAATGGTTAGGATTTG	-6.70	-5.54	9.67

Continued

novel_mir_310	TTACCAACATTCTGAAGCCGT	1.18	-1.00	7.57
novel_mir_172	TATTGTTAGAGGATAGACTGCCT	-4.94	-5.39	-4.73
miR5813	AACAGCCTCTGGTCGATGGA	-10.77	-7.79	2.89
miR5492	AGAAGGAAGAATTATGAATGAGTT	6.59	-4.07	6.48
novel_mir_1995	CTGGACTTCTTTGACATGAAG	-5.41	-5.26	-3.99
miR7708b-3p	AGAATGGACTGAGAATTGAATGG	-9.99	10.19	10.74
novel_mir_48	CTAGATGGAAGCTGTGGCACGG	5.85	-1.75	4.68
novel_mir_453	CAGGATACCTCGTGGATAAGACT	5.93	-4.80	5.50
miR7995	TTAACACGTAGAACAATAGACATT	-1.16	-4.89	6.68
miR6173	TAGCCGTAAACGATGGATACT	4.75	6.26	8.11
novel_mir_965	GGGGGGTTCGAACTGCTGCCC	3.76	-4.26	-4.99
novel_mir_1345	TGGATGCAACTGTAGTACGGT	-6.04	-1.26	-4.87
novel_mir_187	GCAACTGTGGTACTGTGCCA	-7.41	-5.66	6.15
novel_mir_339	TAATCAAAGATACACAAGGCT	-6.79	-5.33	6.26
novel_mir_1178	AAATCTGTGACTTCGAAACCT	1.55	-1.39	5.95
novel_mir_488	ACCAGCGCTGCACTCGATCAT	-1.49	-5.39	5.88
miR9759	TCATAACAATTGTAGAATTATAAT	1.31	-5.63	7.30
novel_mir_87	TTGGTTGAATGAAAATATAAAAT	-4.70	-4.12	-4.99
novel_mir_208	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	-7.87	-8.33	7.19
novel_mir_397	GGGCATCGGATCGGATTGGA	4.93	4.52	4.29
miR9496	CAGGTTGGGCTTGCTGGGTC	8.02	9.20	9.57
miR172a-5p	GCAGCGTCCTCAAGATTC	1.87	1.96	1.68
miR5712	AATTATTAATAATTGAGTGGAGC	8.84	-6.82	8.63
miR841a-5p	GACGAGACCTTGAAAGCTGAA	-7.59	8.65	-7.44
miR8024a-5p	CGAGATTTTAAAGACTTACAACCT	-7.286	-6.01	-7.51
novel_mir_379	TGACTCGTGAGTTGGCCTTGT	12.63	12.67	13.3
miR2089-5p	TTACCTATGCCACCCATTCTCT	7.63	7.92	7.86

注：表中数值为 2 个样品间表达量的 log₂ 值。

3.6. 自交和异交上调或下调差异表达 miRNA 分析

对自交和异交花柱中持续上调或下调的 miRNA 的分析有助于自交不亲和相关 miRNA 确定。因此本文对自交和异交授粉花柱中持续上调或下调的 miRNA 进行统计,在异交 1~3 d 花柱中持续上调的 miRNA 为 28 个,其中,已知 miRNA 23 个,新 miRNA 5 个。而在异交 1~3 d 持续下调的 miRNA 仅为 4 个,其中,已知 miRNA 2 个,新 miRNA 2 个。

在自交在异交 1~3 d 花柱中持续上调的 miRNA 为 21 个,其中,已知 miRNA 20 个,新 miRNA 1 个。持续下调的 miRNA 为 12 个,其中,已知 miRNA 7 个,新 miRNA 5 个。

3.7. 自交和异交花柱特有差异表达 miRNA 及其靶基因功能

对沙田柚自交授粉和异交授粉的特有 miRNA 及靶基因参与的 GO 与 KO 代谢途径进行分析,发现自

交花柱特有的 miRNA 为 40 个,异交花柱特有的 miRNA 共 32 个。这些 miRNA 靶基因的功能涉及到 RNA 降解、转录因子、植物激素、植物与病原菌相互作用、结合功能、激酶以及蛋白质在内质网的合成等代谢过程。

4. 讨论与结论

目前,已有研究表明 miRNA 在植物发育过程中扮演着重要角色,但关于 miRNA 与植物自交不亲和的相关性研究很少。本研究通过 sRNA 测序,在沙田柚自交与异交花柱中鉴定出了多个差异表达的已知 miRNA 和新 miRNA,以及在自交和异交花柱中特异表达的 miRNA,并对这些 miRNA 进行靶基因预测对靶基因进行 GO、KO 功能注释,筛选出可能与自交不亲和反应相关的 miRNA。

4.1. 异交花柱中与自交不亲和相关的特异表达 miRNA

在异交花柱特有的 miRNA 中,novel_mir_1240 靶基因功能为 E3 泛素蛋白连接酶以及 S-位点糖蛋白;novel_mir_1305 靶基因功能为 β -1,4-内切葡聚糖水解酶和内切葡聚糖酶;miR7545 靶基因功能为细胞骨架组织、调节 ARF 蛋白信号传导、果糖激酶;novel_mir_1399 靶基因功能包括 F-box 蛋白和 cyclin 蛋白;novel_mir_1303 靶基因功能为乙烯应答转录因子。这些 miRNA 只在沙田柚异交样品中特异性表达而在自交样品中不表达,说明这些 miRNA 起负调控作用,抑制其对应的靶基因在异交花柱中的表达,使得异交花粉管正常生长而自交花柱被抑制发生自交不亲和反应。由于这些 miRNA 大部分为新的 miRNA,关于其在自交不亲和中的具体功能还需进一步研究。

4.2. 自交花柱中与自交不亲和相关的特异表达 miRNA

在自交样品中特异性表达的 miRNA 包括:novel_mir_2344 靶基因功能为果胶酯酶抑制剂;miR9470-3p 靶基因功能有 γ -氨基丁酸(GABA)受体和参与糖酵解途径;miR9560a-5p 靶基因功能为壁相关受体激酶;miR395 靶基因功能为半乳糖代谢和在细胞壁的合成中也发挥一定作用;miR2118b 靶基因功能为热激蛋白和分子伴侣功能;miR8775 靶基因功能包括有泛素调节蛋白酶体途径。花粉管在花柱中的生长过程中,需要果胶酯酶水解柱头细胞壁的果胶使得花粉管能继续生长,同时,花粉管的伸长也需要不断的合成细胞壁。此外,阿拉伯半乳糖蛋白在花粉管生长和引导等方面发挥着作用。而 novel_mir_2344、miR9560a-5p 和 miR395 在自交样品中特异性表达,说明这些 miRNA 可能负调控其靶基因的表达,使自交花柱中的花粉管生长受阻。

GABA 在花粉-雌蕊互作中起到信号作用,且 GABA 的浓度梯度被破坏时会使花粉管生长异常[19][20],同时花粉管的生长需要能量,糖酵解途径可以提供大量的能量,miR9470-3p 靶基因功能为 GABA 受体以及参与糖酵解途径,说明可能通过负调控靶基因使得 GABA 浓度发生改变以及破坏花粉管生长的所需的能量供应,使花粉管生长受到影响。

Poulter 等[21]在拟南芥自交不亲和样品中发现 5 个热激蛋白/分子伴侣蛋白有着更高的表达量,在自交不亲和中可能有一定的作用,而 miR2118b 的靶基因功能为热激蛋白/分子伴侣蛋白,并在自交中特异性表达,说明该 miRNA 也可能在自交不亲和中发挥作用,关于其功能以及调控方式还有待进一步研究。

在自交样品中,miR9560a-5p 与 novel_mir_651 也表现为持续上调表达,即在自交 3 天过程中一直高表达。其靶基因所对应的功能为蛋白激酶和壁受体相关蛋白激酶,壁受体激酶是一种跨膜蛋白,其胞外结构域与细胞壁中的果胶组分相连接,可能影响细胞壁的合成。而 miR9560a-5p 在自交样品中表达量持续上调,可能对其靶基因发挥负调控作用,使花粉管的细胞壁合成受到影响进而促进自交不亲和反应发生。

novel_mir_651 在自交中也存在差异性表达, 在自交样品中持续上调, 其对应的靶基因功能主要为转录因子以及植物激素信号传导。根据 novel_mir_651 靶基因的 KO 功能注释, 发现靶基因参与植物激素信号传导中油菜素内酯的跨膜运输过程。油菜素内酯主要是通过膜上的 BAK1 和 BRI1 两个载体进出细胞, 而 novel_mir_651 靶基因参与 BRI1 运输油菜素内酯, 油菜素内酯通过修饰细胞壁的方式影响细胞的伸长, 或调控细胞壁合成基因进而影响细胞壁合成。目前已在甜樱桃中发现油菜素内酯诱导花粉管的伸长[22]。novel_mir_651 在自交花柱样品中持续上调且只在自交样品中特异性表达, 说明其可能在自交不亲和反应中对花粉管的伸长发挥一定的作用, 对其靶基因进行负调控作用使花粉管生长受到抑制。

此外, miR845 在自交样品中表现为持续下调, miR51851-3p、miR398a-3p 则为持续上调, 但是没有发现相应的靶基因, 关于这三个 miRNA 是否参与自交不亲和以及其对应的功能还需要进一步研究。

4.3. 自交与异交花柱中与自交不亲和相关的差异表达 miRNA

4.3.1. miRNA miR160 家族

本研究获得三个 miR160 家族的 miRNA, 包括 miR160a-5p、miR160g、miR160b。它们共同作用的靶基因为生长素应答因子 auxin response factor。生长素能促进细胞的伸长和分裂, 其信号传导在调节花粉管伸长过程发挥至关重要的作用[23]。对花粉中特有的生长素输出载体 PIN8 的研究也表明生长素在花粉管生长中发挥作用[24]。Pin8 突变型花粉与野生型花粉相比萌发率下降, 当 pin8 在花粉中过表达花粉管伸长时对 NPA (萘基邻氨基苯甲酸, 抑制生长素运输) 的抗性增强[25]。对 miR160 家族的靶基因进行 KO 注释, 发现靶基因都注释到生长素运输途径中的 ARF 家族转录因子。由此可知, miR160 家族 miRNA 负调控生长素在自交花粉管的转运, 使得花粉管生长受阻, 可能是自交不亲和反应的部分原因。

4.3.2. miR5059 和 miR172a-5p

miR5059 靶基因数目较多, 靶基因功能包括有磷脂酶 D、E3 泛素蛋白连接酶、木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶和生长素应答蛋白等。其中生长素应答蛋白基因的 KO 注释为 AUX/IAA, 除了在传导生长素信号途径中发挥作用, 同时 AUX/IAA 还连接着植物信号传导途径中的生长素传导途径与泛素调节蛋白酶体途径。而 miR172a-5p 靶基因则注释到泛素调节蛋白酶体途径中的 E3 复合体的 skp1。miR172a-5p 靶基因功能还包括有三角状五肽(PPR)、谷氨酰转移酶、泛素系统组成成分和 ABC 蛋白组成蛋白等。S-RNase 对自我花粉管发挥细胞毒素作用, 也可能通过核酸酶活性直接抑制自我花粉管生长[26], 或者间接发挥细胞毒素作用导致细胞死亡[27]。miR5059 和 miR172a-5p 的靶基因参与了泛素调节蛋白酶体的代谢途径, 通过非自我 S-RNase 解毒作用, 可能在自交不亲和反应中发挥了重要作用。

4.3.3. novel_mir_1770

novel_mir_1770 靶基因功能注释之一为磷脂酰肌醇 4-激酶的靶基因, KO 注释包括有肌醇磷酸代谢和磷脂酰肌醇信号系统。在肌醇磷酸信号途径中, 磷脂酰肌醇 4-激酶主要把甘油磷酸代谢途径产生的 Phosphatidyl-1D-*myo*-inositol 传递并转换成 1-Phosphatidyl-1D-*myo*-inositol-4p(PI(4)P), 随后转化为 PI(4,5)P₂。而 PI(4,5)P₂ 在花粉管生长过程中对囊泡运输以及细胞骨架重排中发挥着重要作用[19]。过多或过少的 PI(4,5)P₂ 都会影响囊泡运输, 从而影响花粉管的生长[28]。所以, novel_mir_1770 也可能参与到沙田柚自交不亲和反应中。

总之, 沙田柚的自交不亲和反应过程涉及到众多的复杂反应过程, 但目前关于 miRNA 与植物自交不亲和的相关性研究很少, 值得开展深入研究, 以期阐明沙田柚自交不亲和的分子机理。

基金项目

国家自然科学基金(31360477); 广西教育厅项目(2013YB036)。

参考文献

- [1] Takayama, S. and Isogai, A. (2005) Self-Incompatibility in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 467-489. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144249>
- [2] Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T. and Ikehashi, H. (1996) Self-Incompatibility (S) Alleles of the Rosaceae Encode Members of a Distinct Class of the T₂/S Ribonuclease Superfamily. *Molecular and General Genetics MGG*, **250**, 547-557. <https://doi.org/10.1007/BF02174443>
- [3] Anderson, M.A., Mcfadden, G., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., *et al.* (1989) Sequence Variability of Three Alleles of the Self-Incompatibility Gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell*, **1**, 483-491. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.5.483>
- [4] Ai, Y.J., Singh, A., Coleman, C.E., Ioerger, T.R., Kheyr-Pour, A. and Kao, T.-H. (1990) Self-Incompatibility in *Peitunia inflata*: Isolation and Characterization of cDNAs Encoding Three S-Allele-Associated Proteins. *Sexual Plant Reproduction*, **3**, 130-138. <https://doi.org/10.1007/BF00198857>
- [5] Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H.G. and Coen, E.S. (1996) Origin of Allelic Diversity in *Antirrhinum* S Locus RNases. *Plant Cell*, **8**, 805-814. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.5.805>
- [6] Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.S., Kai, N., *et al.* (2000) The Pollen Determinant of Self-Incompatibility in *Brassica campestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 1920-1925. <https://doi.org/10.1073/pnas.040556397>
- [7] 薛妙男, 陈腾士, 杨继华. 沙田柚自交和异交亲和性观察[J]. 园艺学报, 1995, 22(2): 127-132.
- [8] 薛妙男, 杨继华. 沙田柚花粉管在花柱中的生长途径及其识别[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2001, 19(2): 60-66.
- [9] 杨继华, 李红艳, 薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白的分离与鉴定[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2000, 18(4): 66-70.
- [10] 杨继华, 尧桂荣, 薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白的纯化和 N-端序列测定[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2001, 19(1): 72-79.
- [11] 秦新民, 李惠敏, 薛妙男, 等. 沙田柚自交, 异交花粉管蛋白的双向电泳分析[J]. 广西植物, 2004, 24(6): 566-569.
- [12] 秦新民, 万珊, 李惠敏, 等. 沙田柚无机焦磷酸酶基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 广西植物, 2015, 35(6): 842-847.
- [13] Qin, X.M., Zhang, Y., Liu, Y.J., Guo, D.N. and Li, H.M. (2018) Molecular Mechanisms Underlying the Participation of Ribonuclease T2 Gene into Self-Incompatibility of *Citrus grandis* var. *Shatianyu* Hort. *Cellular and Molecular Biology*, **64**, 126-132. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.2.22>
- [14] Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, **116**, 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- [15] Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2006) MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 19-53. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>
- [16] Lang, Q.L., Jin, C.Z., Lai, L.Y., Feng, J.L., Chen, S.N. and Chen, J.S. (2010) Tobacco MicroRNAs Prediction and Their Expression Infected with Cucumber mosaic Virus and Potato virus X. *Molecular Biology Reports*, **38**, 1523-1531. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0260-6>
- [17] Yu, Y., Jia, T. and Chen, X. (2017) The “How” and “Where” of Plant MicroRNAs. *New Phytologist*, **216**, 1002-1017. <https://doi.org/10.1111/nph.14834>
- [18] 陈伟. 莱芜猪和大白猪背最长肌 miRNA 与 mRNA 转录组测序及特征分析[D]: [博士学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [19] Chapman, L.A. and Goring, D.R. (2011) Misregulation of Phosphoinositides in *Arabidopsis thaliana* Decreases Pollen Hydration and Maternal Fertility. *Sexual Plant Reproduction*, **24**, 319-326. <https://doi.org/10.1007/s00497-011-0172-1>
- [20] Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F. and Preuss, D. (2003) Pollen Tube Growth and Guidance Is Regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* Gene That Controls GABA Levels. *Cell*, **114**, 47-59. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00479-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00479-3)
- [21] Poulter, N.S., Bosch, M. and Franklin-Tong, V.E. (2011) Proteins Implicated in Mediating Self-Incompatibility-Induced

Alterations to the Actin Cytoskeleton of *Papaver* Pollen. *Annals of Botany*, **108**, 659-675.

<https://doi.org/10.1093/aob/mcr022>

- [22] Hewitt, F.R., Hough, T., O'Neill, P., Sasse, J.M., Williams, E.G. and Rowan, K.S. (1985) Effect of Brassinolide and Other Growth Regulators on the Germination and Growth of Pollen Tubes of *Prunus avium* Using a Multiple Hanging-Drop Assay. *Functional Plant Biology*, **12**, 201-211. <https://doi.org/10.1071/PP9850201>
- [23] Guan, Y., Guo, J., Li, H. and Yang, Z.B. (2013) Signaling in Pollen Tube Growth: Crosstalk, Feedback, and Missing Links. *Molecular Plant*, **6**, 1053-1064. <https://doi.org/10.1093/mp/sst070>
- [24] Bosco, C.D., Dovzhenko, A., Liu, X., Woerner, N., Rensch, T., Eismann, M., *et al.* (2012) The Endoplasmic Reticulum Localized PIN8 is a Pollen-Specific Auxin Carrier Involved in Intracellular Auxin Homeostasis. *The Plant Journal*, **71**, 860-870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05037.x>
- [25] Ding, Z.J., Wang, B.J., Moreno, I., Dupláková, N., Simon, S., Carraro, N., *et al.* (2012) ER-Localized Auxin Transporter PIN8 Regulates Auxin Homeostasis and Male Gametophyte Development in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, **3**, Article No. 941. <https://doi.org/10.1038/ncomms1941>
- [26] McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A., *et al.* (1990) Self-Incompatibility in *Nicotiana alata* Involves Degradation of Pollen rRNA. *Nature*, **347**, 757-760. <https://doi.org/10.1038/347757a0>
- [27] Wang, C.L., Xu, G.H., Jiang, X.T., Chen, G., Wu, J., Wu, H.-Q. and Zhang, S.-L. (2009) S-RNase Triggers Mitochondrial Alteration and DNA Degradation in the Incompatible Pollen Tube of *Pyrus pyrifolia* *in Vitro*. *The Plant Journal*, **57**, 220-229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03681.x>
- [28] 高亢, 杜娟, 侯名语, 等. 肌醇磷脂信号组分调节花粉发育和花粉管生长的研究进展[J]. 植物学报, 2013, 48(2): 210-218.