

大豆 *GmGST12* 基因的克隆及表达分析

韩少怀, 李佳佳, 张璟曜, 张浩, 李艳伟, 丁先龙, 贺亭亭, 杨守萍

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要:植物中的活性氧(ROS)作为细胞内或细胞间的信号起重要作用,但其浓度过高可能会导致植物出现雄性不育,而谷胱甘肽 S-转移酶类(GSTs)对于解除 ROS 对细胞的毒害具有重要作用。前期在大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的比较转录组学研究发现一个差异表达基因 *GmGST12*。本研究通过同源克隆法从 NJCMS1A 和 NJCMS1B 花蕾中克隆了 *GmGST12* 基因,其编码区序列(CDS)全长均为 708 bp,且核苷酸序列相同,编码含 235 个氨基酸的谷胱甘肽 S-转移酶;系统发生分析表明,*GmGST12* 与拟南芥 *AtGSTU9* 的同源性最高,二者氨基酸序列相似度为 52%;组织表达分析表明,*GmGST12* 在 NJCMS1A 花蕾中的表达水平极显著地高于 NJCMS1B 花蕾中的表达水平,而在根、茎和叶中的表达水平差异不显著;亚细胞定位结果显示 *GmGST12* 定位于细胞核和细胞质中;此外,还构建了植物过表达载体 pCambia3301-*GmGST12*,以用于下一步转基因功能验证研究。以上结果为进一步研究大豆质核互作雄性不育的分子机理提供了基础。

关键词:大豆;质核互作雄性不育;谷胱甘肽 S-转移酶;基因克隆;表达分析

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0782

Cloning and Expression Analysis of *GmGST12* in Soybean

HAN Shao-huai, LI Jia-jia, ZHANG Jing-yao, ZHANG Hao, LI Yan-wei, DING Xian-long, HE Ting-ting, YANG Shou-ping

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/MOA Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean(General)/National Key Laboratory of Grop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: The reactive oxygen species (ROS) play an important role in plants which act as intracellular or intercellular signals. But high concentration of ROS might lead to plant male sterility. Glutathione S-transferases (GSTs) are crucial to the detoxification for the cells. Based on comparative transcriptome analysis between the cytoplasmic-nuclear male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in *Glycine max*, a differential expression gene of *GmGST12* was identified in our previous research. In the present study, *GmGST12* gene was cloned from the flower buds of NJCMS1A and NJCMS1B by homology-based cloning method. The coding DNA sequences (CDSs) of *GmGST12* from NJCMS1A and NJCMS1B were 708 bp long with the same nucleotide sequences and coded the glutathione S-transferases protein consisted of 235 amino acids. Phylogenetic analysis showed that the homology between *GmGST12* and *AtGSTU9* from *Arabidopsis thaliana* was the highest and the identity of the amino acid sequences was 52%. The tissues expression analysis showed that the mRNA expression level of *GmGST12* in flower buds of NJCMS1A was significantly higher than that in flower buds of NJCMS1B, but no difference was found in root, steam and leaf. The result of subcellular localization indicated that *GmGST12* was located in the cytoplasm and nucleus. In addition, the plant overexpression vector pCambia3301-*GmGST12* was constructed for further transgenic research. All the above results provided the foundation for future study on the molecular mechanism of cytoplasmic-nuclear male sterility in soybean.

Keywords: *Glycine max*; Cytoplasmic-nuclear male sterility; Glutathione S-transferases (GSTs); Gene cloning; Expression analysis

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]是重要的蛋白质和油料作物,然而,其产量较低,严重制约着大豆产业化的发展。杂种优势利用是提高大豆产量的有效途径之一,质核互作雄性不育在大豆杂种优势利用中具有重要作用。目前,已经从三系选育、遗传学、细胞学和分子生物学等方面对大豆质核互作雄性不育进行了广泛研究^[1-13],但是大豆质核互作雄性不育的分子机理仍不清楚。

收稿日期:2014-12-23
基金项目:国家高技术发展研究计划“863 计划”(2011AA10A105);国家转基因重大专项(2011ZX08004-005, 2013ZX08004-005, 2014ZX08004-005);教育部长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT13073);江苏省现代作物生产协同创新中心。
第一作者简介:韩少怀(1987-),男,硕士,主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail:2012101008@njau.edu.cn。
通讯作者:杨守萍(1967-),女,博士,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:spyung@126.com。

近年来,多数学者认为植物质核互作雄性不育和线粒体功能异常有直接关系,线粒体信号通路影响核基因的表达并调控其它的细胞功能,其中最关注的是活性氧(Reactive oxygen species, ROS)介导的细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)^[14-19]。Peng 等^[20]发现在 CMS-HL 型水稻中,除了出现雄性不育的表型外小孢子中 ROS 的含量出现过量积累。植物中,谷胱甘肽 S-转移酶类(Gluthathione S-transferase, GSTs)由一个巨大且种类繁多的基因家族所编码,基于序列亲缘关系、免疫互作反应、动力学性质和基因组结构,植物中的 GSTs 被划分为 7 个不同的亚家族,其中 Phi、Tau、Lambda 和 DHAR 类 GST 为植物所特有^[21]。有研究表明 GSTs 能够通过解除活性亲电子复合体来抵御一系列生物和非生物胁迫的伤害^[21-25],其中 GSTs 在抵御 ROS 对细胞的毒害中具有关键作用^[26-27]。

前期在大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的比较转录组学研究发现一个差异表达基因 *GmGST12*。本研究通过同源克隆法从 NJCMS1A 和 NJCMS1B 花蕾中克隆了 *GmGST12* 基因,并研究了其在 NJCMS1A 和 NJCMS1B 不同组织中的表达情况以及在拟南芥原生质体中的亚细胞定位情况,同时构建了植物过表达载体 pCambia3301-*GmGST12*,旨在为进一步研究 *GmGST12* 与大豆质核互作雄性不育的关系提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 由国家大豆改良中心种质资源库提供,于 2013 年夏种植于南京农业大学国家大豆改良中心江浦试验站。于大豆开花期分别采集植株的根、茎、叶和花蕾组织,经液氮速冻后于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

采用 RNAsimple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型,天根生化科技(北京)有限公司)提取大豆根、茎、叶和花蕾组织的总 RNA,使用 Prime-Script™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)合成 cDNA 第一链,具体方法参考试剂盒说明书。

1.3 *GmGST12* 基因的克隆

采用同源克隆法,利用 *GmGST12* 基因 ID(Glyma06g20730)在大豆基因组数据库(<http://www.phytozome.net/soybean>)中进行检索,获取该基

因的开放阅读框(ORF)序列。使用 Primer premier 5 软件设计覆盖完整 ORF 的特异引物序列,用于 RT-PCR 扩增,其上游引物 *GmGST12*-F 的序列为 5'-ATGGCAGAGCAAGACAAGGTGATC-3',下游引物 *GmGST12*-R 的序列为 5'-TCATTCTGTGGCAGAAG-AAGATTTTCAG-3'。PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 5 min, (94℃ 15 s, 60℃ 5 s, 72℃ 20 s) 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。使用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳,将 PCR 产物回收并连接至 PMD19-T vector(宝生物工程(大连)有限公司),再转化大肠杆菌感受态细胞,筛选阳性克隆后送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

使用 ExPASy ProtPara (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)对 *GmGST12* 基因编码的氨基酸序列、蛋白质的分子量和等电点进行分析,利用 GOR4 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=npsagor4.html)和 Tmpred (http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)预测 *GmGST12* 蛋白的二级结构和跨膜结构,采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)搜索 *GmGST12* 蛋白的氨基酸序列中的保守结构域,使用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对 *GmGST12* 蛋白进行信号肽预测,利用 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)对 *GmGST12* 蛋白的亚细胞定位进行预测,采用 Clustal X 2.0 对 *GmGST12* 蛋白的氨基酸序列与 NCBI 上登录的其它植物 GST 蛋白的氨基酸序列进行比对,并使用 MEGA 6.0 绘制进化树。

1.5 *GmGST12* 在 NJCMS1A 和 NJCMS1B 中的组织表达分析

以合成的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 分析,大豆 *Tubulin* 基因为内参。*Tubulin* 上游引物 *Tu*-RT-F 的序列为 5'-GGAGTTCACAGAGGCAGAG-3',下游引物 *Tu*-RT-R 的序列为 5'-CACTTACGCATCACATAGCA-3'。*GmGST12* 上游引物 *GmGST12*-RT-F 的序列为 5'-CCAGGATCAGTTAATGGAGAGCAC-3',下游引物 *GmGST12*-RT-R 的序列为 5'-TCTCATACACGTGGTCAATGGC-3'。PCR 程序为 95℃ 10 min, (95℃ 15 s, 60℃ 1 min) 40 个循环。采用 3 次生物学重复。

1.6 植物亚细胞定位载体 PJIT166-*GmGST12*-GFP 的构建

以测序正确且连有目的基因的质粒为模板,设计添加酶切位点的特异性引物。上游引物 pJIT166-*GmGST12*-GFP-F 的序列为 5'-ACAACACTCTAGAAT-

GGCAGAGCAAGACAAGGT-3',下划线为 *Xba* I 酶切位点;下游引物 pJIT166-*GmGST12*-GFP-R 的序列为 5'- ACAACAGGATCCCTTCTGTGGCAGAGAAGATTTC-3',去掉终止密码子 TAA,下划线为 *Bam*H I 酶切位点。将扩增的片段连接到亚细胞定位载体 pJIT166-GFP 得到重组质粒 pJIT166-*GmGST12*-GFP。

参考廖嘉明等^[28]的方法,进行拟南芥原生质体的分离和转化。取 21~28 d 的野生型拟南芥叶片,分离其原生质体,将构建的 pJIT166-*GmGST12*-GFP 质粒转化到原生质体中进行表达,12 h 暗培养后,利用激光共聚焦显微镜 (LSM780, Zeiss, Germany) 观察融合蛋白 *GmGST12*-GFP 的分布情况。

1.7 植物过表达载体 pCambia 3301-*GmGST12* 的构建

以测序正确且连有目的基因的质粒为模板,设计分别含有 *Bgl* II 和 *Bst*E II 酶切位点的特异性引物。上游引物 pCambia3301-*GmGST12*-F 的序列为 5'-GGAAGATCTATGGCAGAGCAAGACAAGGTGA-3',下划线为 *Bgl* II 酶切位点;下游引物 pCambia3301-*GmGST12*-R 的序列为 5'-ATCGGTGACCTCATTCTGTGGCAGAGAAGATTTC-3',下划线为 *Bst*E II 酶切位点。

将扩增的片段连接到 pCambia3301 载体,得到植物过表达载体 pCambia3301-*GmGST12*,然后利用冻融法转化根癌农杆菌菌株 EHA105,获得携带有过表达载体的菌株,以用于下一步转基因功能验证研究。

2 结果与分析

2.1 *GmGST12* 基因的克隆

采用同源克隆法,利用 *GmGST12* 基因 ID (Glyma06g20730) 在大豆基因组数据库 (<http://www.phytozome.net/soybean>) 中进行检索,获取该基因的开放阅读框 (ORF) 序列,使用 Primer premier 5 软件设计覆盖完整 ORF 的特异性引物序列,用于 RT-PCR 扩增。

分别以大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的花蕾总 RNA 为模板,通过

RT-PCR 扩增获得 *GmGST12* 基因的特异性片段 (图 1),测序结果表明它们均含有 *GmGST12* 基因的全长编码区序列 (CDS),其长度为 708 bp,且核苷酸序列相同,与大豆基因组数据库 (<http://www.phytozome.net/soybean>) 中公布的大豆 Williams 82 的第 6 号染色体上的 *GmGST12* 基因 (Locus name: Glyma06g20730) 的序列存在一个碱基的差异,但所编码氨基酸序列相同。

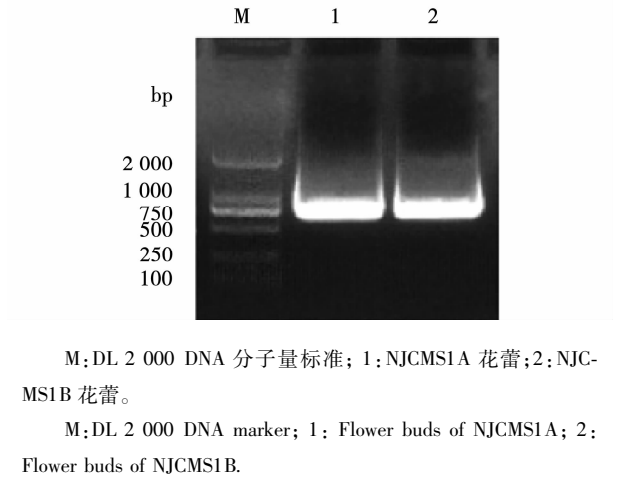


图 1 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 花蕾中 *GmGST12* 基因的 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 RT-PCR products of *GmGST12* in flower buds of cytoplasmic-nuclear male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybeans

2.2 *GmGST12* 的生物信息学分析

序列分析表明克隆的 *GmGST12* 编码 235 个氨基酸残基,蛋白质分子量为 26.6 kDa、等电点为 5.84,不稳定指数为 33.73,为稳定蛋白。二级结构预测显示 *GmGST12* 具有 46.81% α 螺旋、14.47% 衍生链和 38.72% 无规则卷曲。跨膜信号分析表明 *GmGST12* 的第 182~203 位氨基酸处存在一个明显的跨膜螺旋。SMART 分析显示 *GmGST12* 蛋白包含 GST_N 和 SCOP 两个保守结构域 (图 2)。SignalP 分析表明 *GmGST12* 蛋白没有典型的信号肽序列,不属于分泌型蛋白。TargetP 预测显示 *GmGST12* 蛋白没有明显的亚细胞定位。

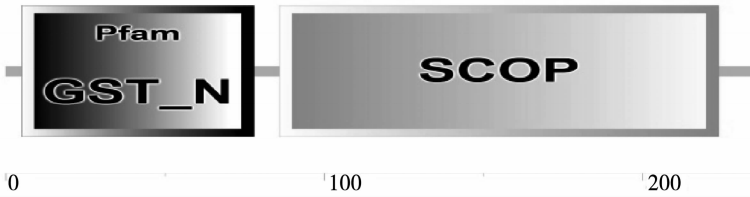


图 2 *GmGST12* 蛋白的保守结构域

Fig. 2 Conserved domain of *GmGST12* protein

以 *GmGST12* 的氨基酸序列为探针,采用 NCBI 数据库中的 BLASTp 程序检索 GeneBank 的 NR 数据库。结果从拟南芥、辣椒、可可、玉米、水稻等植物中检索到一些与 *GmGST12* 相似的蛋白,其中与拟南芥 *AtGSTU9*(*Arabidopsis thaliana*, NP_851249.1)、辣椒 *CeGST12*(*Capsicum chinense*, CAJ13709.1) 和可

可 *TeGSTU9*(*Theobroma cacao*, XP_007037326.1) 的相似性较高(图 3),序列相似度分别为 52%、53% 和 59%。系统进化分析结果表明 *GmGST12* 与拟南芥 *AtGSTU9* 的同源性最高,同属于 Tau 类 GST(图 4)。

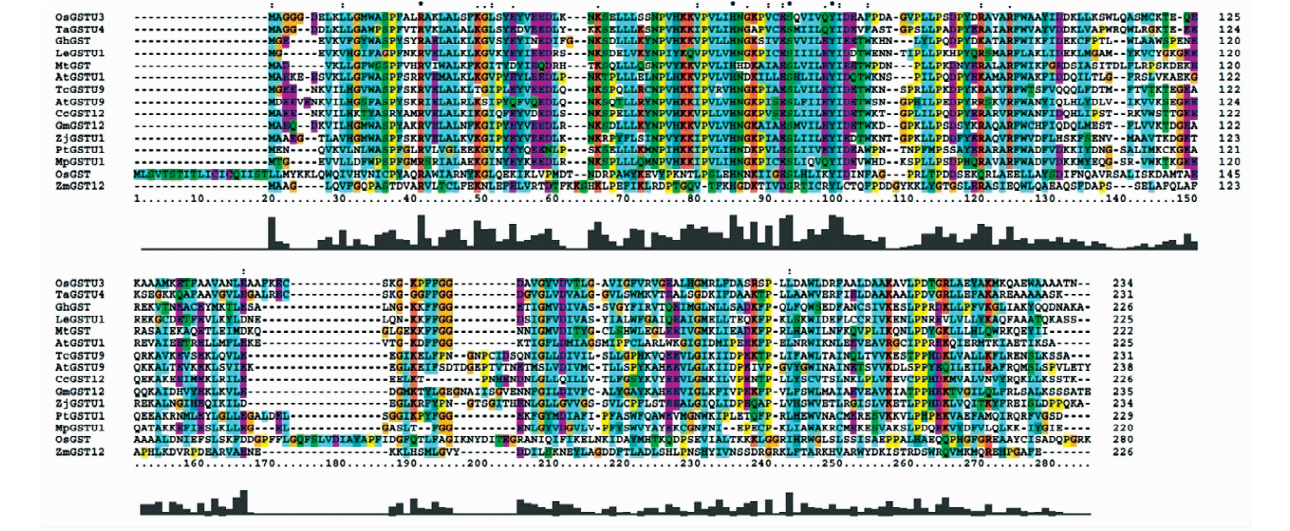


图 3 *GmGST12* 与其它植物 GSTs 的氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequences alignment between *GmGST12* and other GST proteins in plants

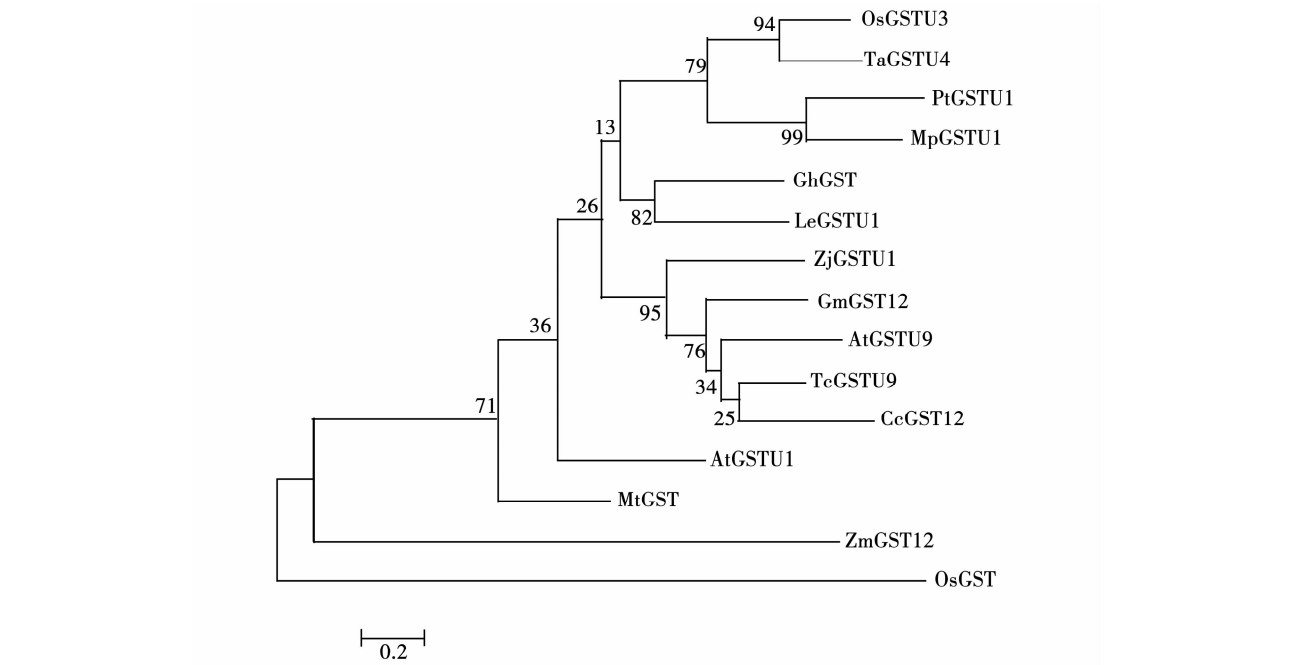


图 4 *GmGST12* 和其它植物中 GST 蛋白的系统进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree between *GmGST12* and other GST proteins in plants

2.3 *GmGST12* 在 NJCMS1A 和 NJCMS1B 中的组织表达分析

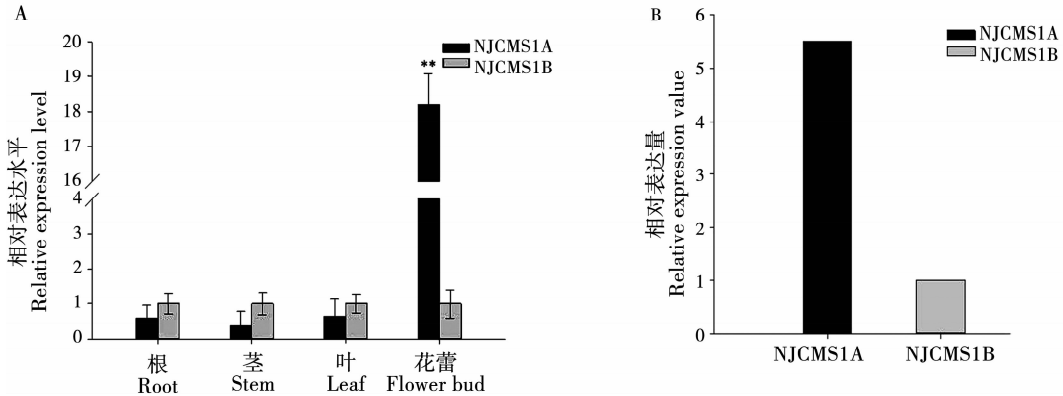
实时荧光定量 PCR 检测结果显示,*GmGST12* 在 NJCMS1A 和 NJCMS1B 的根、茎、叶和花蕾组织中均有表达,其中根、茎和叶中的表达水平差异不显著,

而花蕾中的表达水平差异达极显著。NJCMS1A 中 *GmGST12* 的表达量约是 NJCMS1B 中的 18 倍(图 5A),与比较转录组学研究结果相一致(以 NJCMS1B 为对照, *GmGST12* 在 NJCMS1A 中上调表达 5.5 倍)(图 5B)。

2.4 GmGST12 的亚细胞定位

利用双酶切法构建了亚细胞定位载体 pJIT166-GFP-GmGST12(图 6 和图 7)。亚细胞定位结果表明

在拟南芥原生质体的细胞核和细胞质中均可检测到 GFP 信号(图 8),初步证明 GmGST12 定位于细胞核和细胞质中。



A:实时荧光定量 PCR 结果;B:比较转录组学研究结果。
A: The result of real-time PCR;B:The result of comparative transcriptome analysis.

图 5 GmGST12 在大豆细胞质雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 中的组织表达分析

Fig. 5 Tissues expression pattern of *GmGST12* in cytoplasmic-nuclear male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybeans

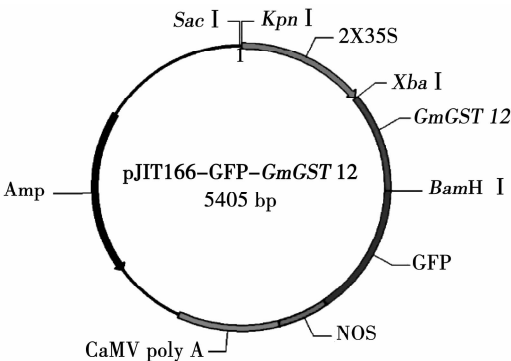
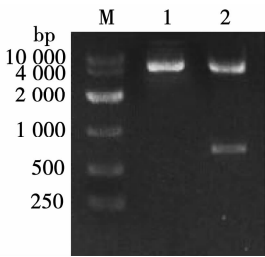


图 6 植物亚细胞定位载体 PJIT166-GFP-GmGST12 的图示

Fig. 6 The map of plant subcellular localization vector pJIT166-GFP-GmGST12



M:DL 10 000 DNA 分子量标准;1: pJIT166-GFP-GmGST12 质粒阳性对照;2: *Xba* I/*Bam* H I 双酶切片段。

M:DL 10 000 DNA marker;1:Positive control of pJIT166-GFP-GmGST12 vector;2:Fragments of vector digested by *Xba* I and *Bam* H I.

图 7 限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam* H I 的酶切结果

Fig. 7 The double digestion result of *Xba* I and *Bam* H I

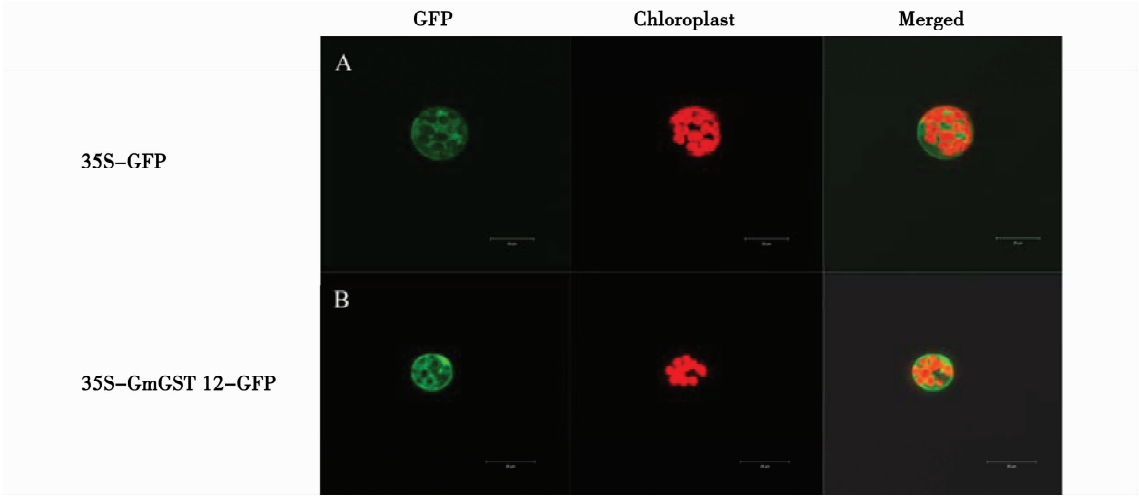


图 8 GmGST12-GFP 融合蛋白在拟南芥原生质体中的亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of *GmGST12*-GFP fusion protein in protoplast of *Arabidopsis thaliana*

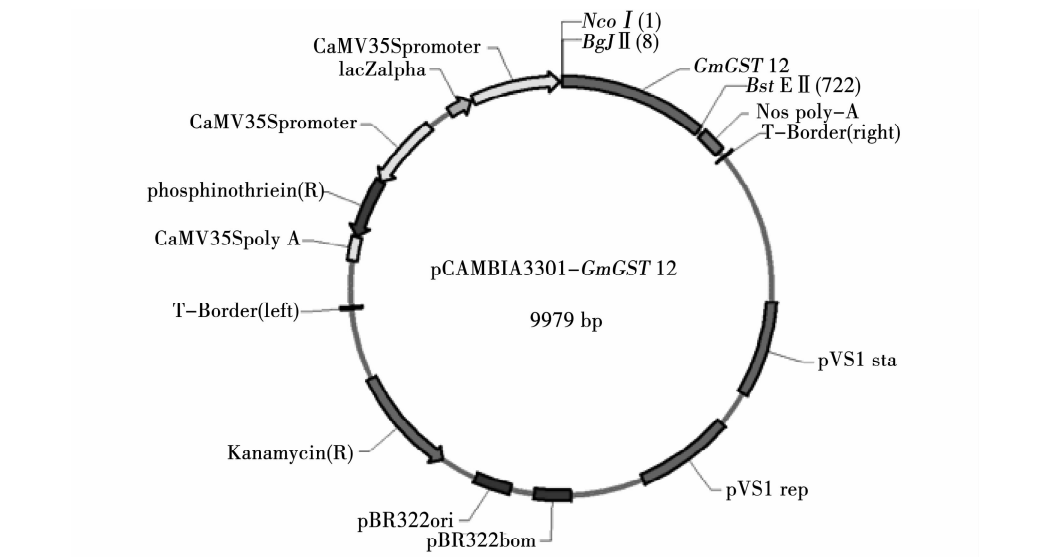
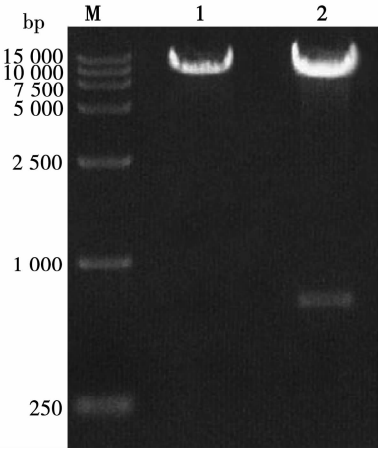


图 9 植物过表达载体 pCambia3301-*GmGST12* 的图示

Fig. 9 The map of plant overexpression vector pCambia3301-*GmGST12*



M:DL 15 000 DNA 分子量标准; 1:pCambia3301-*GmGST12* 质粒阳性对照; 2:*Bgl* II/*Bst* EII 双酶切片段。

M: DL 15 000 DNA marker; 1: Positive control of pCambia3301-*GmGST12* vector; 2: Fragments of vector digested by *Bgl* II and *Bst* E II.

图 10 限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Bst* E II 的酶切结果

Fig. 10 The double digestion result of *Bgl* II and *Bst* E II

2.5 *GmGST12* 植物过表达载体的构建

利用双酶切法构建了植物过表达载体 pCambia3301-*GmGST12*(图 9)。利用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Bst* E II 将构建的载体切成9 131 和 708 bp 的两个片段(图 10),表明表达载体构建成功。

3 结论与讨论

前期在大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的比较转录组学研究发现一个差异表达基因 *GmGST12*。本研究通过同源克隆法从 NJCMS1A 和 NJCMS1B 花蕾中克隆了 *GmGST12* 基因,其编码区序列(CDS)全长均为 708 bp,且核苷酸序列相同,编码含 235 个氨基酸的谷胱甘肽 S-转移酶,组织表达分析结果表明 *GmGST12* 在

NJCMS1A 花蕾中的表达水平极显著地高于 NJCMS1B 花蕾中的表达水平,这与比较转录组学研究结果相一致,亚细胞定位结果表明 *GmGST12* 定位于细胞核和细胞质中,说明它可能在全细胞水平上发挥作用。

GSTs 是一个大基因家族编码的多功能蛋白,不仅参与对外源物质的解毒,还参与内源代谢^[29],它可以作为谷胱甘肽(GSH)依赖的异构酶、非催化性黄酮类结合蛋白和逆境信号蛋白发挥作用,也可以调控细胞凋亡^[30]。Willekens 等^[24]研究表明,GST、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)在植物响应由多种环境条件诱导的氧化胁迫中具有重要作用。Sharma 等^[31]在拟南芥中过表达了一个水稻 Tau 类 GST 基因,结果显示过表达拟南芥转基因株系表现出少量的 ROS 积累和 GST 活性升高,此外 GST 和编码抗氧化酶基因的转录本水平也有升高。Yu 等^[25]研究表明,烟草中过表达棉花 GST 基因能增强植株的抗氧化能力。这说明 GSTs 对响应由内源或外源因素诱导产生的 ROS 并解除其对细胞的毒害起重要作用。

目前,植物雄性不育的发生与线粒体的功能障碍存在直接关系的观点已得到广泛认同^[14-19],而其中最引人注目的是细胞程序性死亡(PCD)与植物雄性不育的关系。研究表明植物 PCD 通路中 ROS 的代谢异常是导致雄性不育的一个重要原因^[20]。本研究推测,*GmGST12* 在 NJCMS1A 花蕾组织中高表达可能是由于线粒体 PCD 通路产生了过量的活性氧,远远超过了细胞自身解毒系统的解毒能力,致使 ROS 毒害细胞并影响其它代谢通路,最终可能导致 NJCMS1A 雄配子细胞死亡而发生雄性不育。本研究还构建了植物过表达载体 pCambia3301-*GmGST12* 并成功转化了农杆菌,为进一步开展 *GmGST12* 转基因大豆功能验证研究奠定了基础。

参考文献

[1] Gai J Y, Cui Z L, Ji D F, et al. A report on the nuclear cytoplasmic male sterility from a cross between two soybean cultivars[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1995, 22: 55-58.

[2] 孙寰, 赵丽梅, 黄梅. 大豆质-核互作不育系研究[J]. 科学通报, 1993, 38(16): 1535-1536. (Sun H, Zhao L M, Huang M. Studies on cytoplasmic-nuclear male sterile line of soybean [J]. Chinese Science Bulletin, 1993, 38(16): 1535-1536.)

[3] Peng Y H, Yang G B, Yuan J Z. Genetic analysis of a new type of male sterile soybean. World Soybean Research Conference V Abstract[C]. Bangkok, Thailand: Funny Publishing Limited Partnership, 1994, 90.

[4] 李磊, 杨庆芳, 胡亚敏, 等. 栽培大豆双亲基因互作型不育材料的发现及其遗传推断[J]. 安徽农业科学, 1995, 23(4): 304-306. (Li L, Yang Q F, Hu Y M, et al. Discovery of parent interaction sterile material of soybean cultivar and its genetic inference [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 1995, 23(4): 304-306.)

[5] 张磊, 戴瓯和, 黄志平, 等. 大豆质核互作 M 型雄性不育系的选育及其育性表现[J]. 中国农业科学, 1999, 32(4): 34-38. (Zhang L, Dai O H, Huang Z P, et al. Selection of soybean male sterile line of nucleo-cytoplasmic interaction and its fertility [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999, 32(4): 34-38.)

[6] Ding D R, Gai J Y, Cui Z L, et al. Development and verification of the cytoplasmic-nuclear male sterile soybean line NJCMSIA and its maintainer NJCMSIB[J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(2): 191-192.

[7] Ding D R, Gai J Y, Cui Z L, et al. Development of a cytoplasmic-nuclear male-sterile line of soybean[J]. Euphytica, 2002, 124(1): 85-91.

[8] 凡军民: 大豆质核互作雄性不育系的细胞形态学和细胞化学特征的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2003. (Fan J M. Studies on cyto-morphological and cyto-chemical features of cytoplasmic-nuclear male-sterile lines of soybean(*Glycine max*(L.) Merrill). Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003.)

[9] Yang S P, Duan M P, Meng Q C, et al. Inheritance and gene tagging of male fertility restoration of cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMSIA in soybean[J]. Plant Breeding, 2007, 126(3): 302-305.

[10] 曾维英, 杨守萍, 盖钧镞, 等. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 及其保持系的花药差异蛋白质组学研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(12): 2679-2687. (Zeng W Y, Yang S P, Gai J Y, et al. Proteomic study of anther differentiation between cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A and its maintainer in soybean [*Glycine max*(L.) Merr.] [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(12): 2679-2687.)

[11] 曾维英, 杨守萍, 喻德跃, 等. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS2A 及其保持系的花药蛋白质组比较研究[J]. 作物学报, 2007(10): 1637-1643. (Zeng W Y, Yang S P, Yu D Y, et al. A comparative study on anther proteomics between cytoplasmic-nuclear male sterile line NJCMS2A and its maintainer of soybean [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(10): 1637-1643.)

[12] 韩利涛, 姜伟, 杨守萍, 等. 大豆细胞质雄性不育系 MADS-box 基因的分离分析[J]. 作物学报, 2010, 36(6): 905-910. (Han L T, Jiang W, Yang S P, et al. Isolation and analysis of MADS-box gene from soybean (*Glycine max* L. Merr.) cytoplasmic male sterile line[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(6): 905-910.)

[13] Jiang W, Yang S P, Yu D Y, et al. Cloning and characterization of a novel gene *GmMFI* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(12): 1834-1841.

[14] Carlsson J, Leino M, Sohlberg J, et al. Mitochondrial regulation of flower development[J]. Mitochondrion, 2008, 8(1): 74-86.

[15] Rhoads D M, Subbaiah C C. Mitochondrial retrograde regulation in plants[J]. Mitochondrion, 2007, 7(3): 177-194.

[16] Andersson S G, Karlberg O, Canbäck B, et al. On the origin of mitochondria: a genomics perspective[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 358(1429): 165-179.

[17] Chinnery P F. Searching for nuclear-mitochondrial genes [J]. Trends in Genetics, 2003, 19(2): 60-62.

[18] Reichert A S, Neupert W. Mitochondriomics or what makes us breathe[J]. Trends in Genetics, 2004, 20(11): 555-562.

[19] Logan D C. Plant mitochondrial dynamics[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1763: 430-441.

[20] Peng X J, Wang K, Hu C F, et al. The mitochondrial gene *orfH79* plays a critical role in impairing both male gametophyte development and root growth in CMS-Honglian rice[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 125.

[21] Dixon D P, Laphorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases [J]. Genome Biology, 2002, 3(3): reviews 3004. 1-reviews 3004. 10.

[22] McGonigle B, Keeler S J, Lau S M, et al. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize[J]. Plant Physiology, 2000, 124(3): 1105-1120.

[23] Dixon D P, Davis B G, Edwards R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(34): 30859-30869.

[24] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, et al. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants [J]. The EMBO Journal, 1997, 16(16): 4806-4816.

[25] Yu T, Li Y S, Chen X F, et al. Transgenic tobacco plants overexpressing cotton glutathione S-transferase (GST) show enhanced resistance to methyl viologen [J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160(11): 1305-1311.

[26] Gallé Á, Csiszár J, Secenji M, et al. Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit [J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(17): 1878-1891.

[27] van Breusegem F, Vranová E, Dat J F, et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction[J]. Plant Science, 2001, 161: 405-414.

[28] 廖嘉明, 王伯初, 王益川, 等. 拟南芥叶肉原生质体分离条件的优化研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(6): 1271-1276. (Liao J M, Wang B C, Wang Y C, et al. Optimization conditions of *Arabidopsis* mesophyll protoplast isolation [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(6): 1271-1276.)

[29] Dixon D P, McEwen A G, Laphorn A J, et al. Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(26): 23930-23935.

[30] Marrs, K A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1996, 47: 127-158.

[31] Sharma R, Sahoo A, Devendran R, et al. Over-expression of a rice tau class glutathione S-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE, 2004, 9(3): e92900.