

甜菜雄性不育系及保持系花期蛋白差异分析

程大友¹, 崔 杰¹, 牛 佳¹, 代翠红¹, 白 晨²

(1.哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 150090 哈尔滨; 2.内蒙古自治区农牧业科学院 甜菜研究所, 010031 呼和浩特)

摘 要: 为揭示甜菜雄性不育的原因,从蛋白质组学角度对甜菜细胞质雄性不育进行研究,利用双向电泳与 MALDI-TOF-MS 方法,对 Owen 型甜菜质核互作型雄性不育系 DY5-CMS 及同型保持系 DY5-O 花粉发育 3 个阶段(雄蕊原基分化期、四分体时期和单核时期)的花蕾蛋白差异表达进行研究.结果表明:在雄蕊原基分化期花蕾中鉴定出 6 个差异蛋白,在四分体时期鉴定出 4 个差异蛋白,这些蛋白多数与呼吸和能量代谢有关,推测甜菜细胞质雄性不育可能是花粉发育早期(雄蕊原基分化期和四分体时期)与能量和呼吸代谢有关的蛋白表达上调导致呼吸和能量代谢紊乱造成的;在花粉发育的单核时期鉴定出 6 个差异蛋白,这些蛋白主要与植物的光合作用有关,推测到花粉发育后期雄性不育性状已形成,雄性不育导致植物光合机能下降.

关键词: 甜菜;花蕾;细胞质雄性不育;2-DE;蛋白质组学

中图分类号: S566.3;Q753 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2014)10-0069-06

Proteomic analysis of florescence differentiation between cytoplasmic male sterile line and maintainer in sugar beet

CHENG Dayou¹, CUI Jie¹, NIU Jia¹, DAI Cuihong¹, BAI Chen²

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;
2. Inner Mongolia Academy of Agricultural Animal Husbandry Sciences, 010031 Hohhot, China)

Abstract: To explore the molecular genetic mechanisms of cytoplasmic male sterility in sugar beet, the differential proteins between the CMS line and its maintainer line were studied. Immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) technique and MALDI-TOF-MS were used to identify differentially expressed proteins in the three pollen development stages(stamen primordium differentiation stage, metaphase and uninucleate stage) between the Owen sugar beet male-sterile line (DY5-CMS) and its maintainer line (DY5-O). Six distinct proteins were identified in the stamen primordium differentiation stage and four distinct proteins were identified in the metaphase. In addition, all those proteins were related to the energy and respiratory metabolism. It was inferred that cytoplasmic male sterility of sugar beet might take place at the prophase of pollen development(contain stamen primordium differentiation stage and metaphase). The over-expression of energy and respiratory metabolism related proteins leads to metabolism disorder. Six distinct proteins are identified in the uninucleate stage of pollen development, and most of the proteins are related to photosynthesis of plants. It is speculated that the male sterility trait has formed at the late stages of pollen development and male sterility leads to the decreasing of photosynthetic.

Keywords: sugar beet; bud; cytoplasmic male sterility; 2-DE; proteomic

收稿日期: 2013-12-10.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271781); 科技部项目(2014EG111232); 现代农业产业体系资助项目(CARS-21010202).
作者简介: 程大友(1962—),男,研究员,博士生导师.
通信作者: 崔 杰, cuijie2006@163.com;
白 晨, nmgnkybc@126.com.

目前利用作物的雄性不育特性生产杂交种已成为异交作物种子生产的主流.研究作物雄性不育分子机理已成为分子育种的研究热点^[1].随着蛋白质组学技术的发展,蛋白质组分析已应用于拟南芥、水稻和西红柿^[2-4]等植物的研究中.在成熟的花粉中大量的蛋白已被鉴定出来.通过对水

稻花药小孢子时期的蛋白质组分析,揭示了富含甘氨酸蛋白、热激蛋白、翻译控制蛋白和一些管家蛋白以及在小孢子发育过程中的潜在因子^[5].在拟南芥雄性不育突变体中,孢子发育时腺嘌呤磷酸核糖转移酶(APRT)活性的丧失被认为是导致不育的原因^[6];水稻的花药中,低温胁迫也能引起雄性不育,这与热激蛋白和 β -拓展蛋白的部分阻断有关^[7],在大豆的雄性不育系 NJCMS1A 及其保持系中鉴定出了一些在乙烯合成、细胞程序性死亡、ATP 合成、淀粉合成过程中起关键作用的蛋白,推测细胞质雄性不育可能是因为这些过程中某蛋白缺失或功能改变,造成这些程序紊乱,进而导致雄性不育^[8];在红莲型水稻的 CMS 花药中发现缺少与乙酰辅酶 A 合成有关的酶(乙酰辅酶 A 合成酶和二氢硫辛酸脱氢酶),导致三羧酸循环(TCA)和脂肪酸代谢不能正常进行,影响呼吸和能量代谢,最终导致细胞质雄性不育^[9].此外,研究发现水稻、小麦、番茄等雄性不育还与光合作用过程中的一些酶有关,如叶绿体氧增强蛋白 1(chloroplast oxygen-evolving enhancer protein 1)和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)^[10-12].因此,推测雄性不育可能与光合酶系的功能缺陷有关.甜菜在育性相关蛋白方面的报道较少,Masayuki P 等在甜菜雄性不育 I-12CMS(3)细胞质中找到一个 12 KD 的蛋白,该蛋白是只在不育系中出现的 *orf129* 的蛋白产物;*Atp6* 的 5'前导序列 *preSatp6* 只在 CMS 型线粒体中表达一种 35 KD 的蛋白^[13-14],推测这两个蛋白可能与雄性不育有关,但是并没有进行进一步的研究.

本文利用 2-DE 与 MALDI-TOF-MS 方法对甜菜质核互作型雄性不育系及保持系花蕾发育的 3 个阶段蛋白差异表达进行研究,以期揭示 Owen 型甜菜不育系与保持系花蕾不同发育时期蛋白表达的差异.

1 实 验

1.1 实验材料

所用材料来自哈尔滨工业大学自育的甜菜不育系 DY5-CMS 及其保持系 DY5-O.经过春化处理的甜菜母根,于 4 月 20 日种植在哈尔滨工业大学甜菜育种试验田,6 月 25 日~7 月 15 日期间进行甜菜花期取样调查.甜菜花蕾发育分成 3 个时期:雄蕊原基分化期、四分体时期及单核时期.

1.2 实验方法

1.2.1 甜菜花蕾蛋白的提取

采用 TCA-丙酮沉淀法提取蛋白^[15],将浓缩后的蛋白干粉置于 -20 °C 保存备用.取 13 mg 浓缩后的蛋白干粉,加入 150 μ L 蛋白裂解液反复冻融使其复融,采用 Bradford 法测定蛋白含量,标准蛋白为牛血清白蛋白(BSA).

1.2.2 双向凝胶电泳

第一向等电聚焦电泳参照 Bio-Rad 公司等电聚焦系统说明书进行;第二向电泳参照文献^[15]方法进行.

1.2.3 MALDI-TOF-TOF/MS 质谱分析

经脱色清洗后,将凝胶扫描采集图像利用 Image Master 2D Platinum 5.0 软件(GE 公司)分析蛋白质图谱.经点探测、匹配,找出差异点.将 3 次重复均出现且特征明显(含量差值大于 2.0 以上的)的差异蛋白点回收后委托广州慧晶生物科技有限公司进行 MALDI-TOF-TOF/MS 质谱分析.

2 结果与分析

2.1 雄蕊原基分化期

对甜菜雄蕊原基分化期花蕾蛋白的差异进行分析,在不育系中检测到蛋白点 405 个,保持系中检测到 325 个(如图 1),检测出的差异蛋白总数在不育系中升高的有 14 个点,在保持系中升高的有 8 个点.

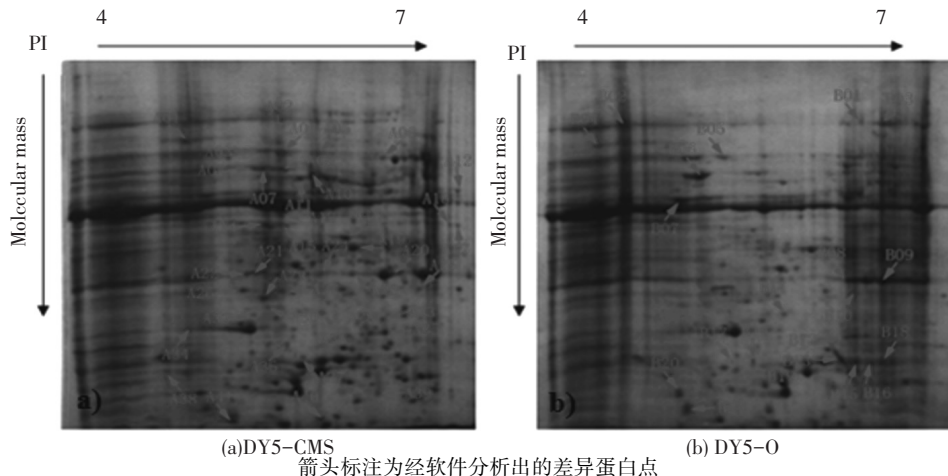


图 1 不育系 DY5-CMS 及其保持系 DY5-O 的 1 期花蕾蛋白 2DE 图谱

利用 PMF 分析获得质谱图(见图 2、3), 去除假阳性点后, 鉴定出 6 种蛋白(见表 1), 即 NADH 脱氢酶、二硫辛酰胺脱氢酶、可溶性无机焦磷酸

酶、ATP 合成酶的 β 亚基和 ATP 合成酶 D 链、葡萄糖调节蛋白同系物。

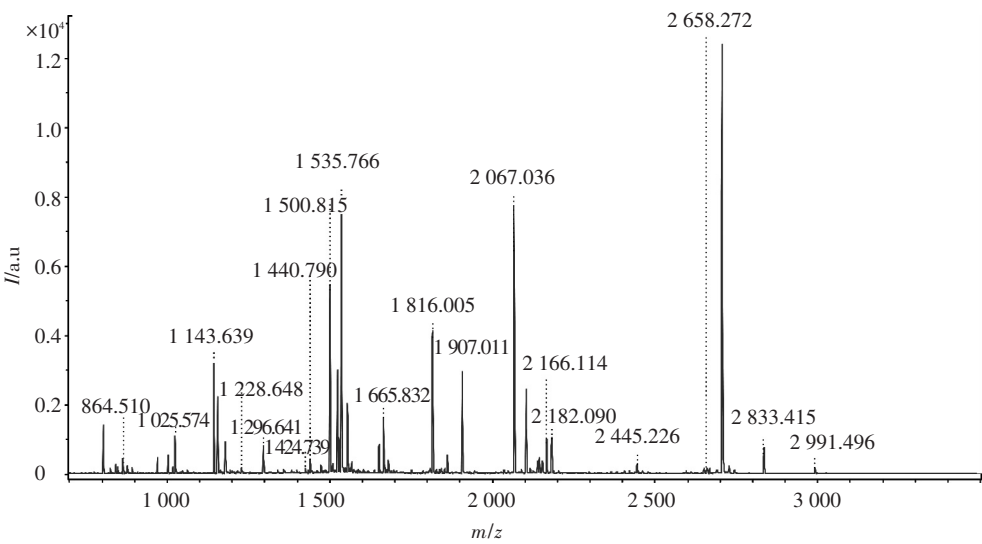


图 2 双向电泳图谱中蛋白点 B05 的肽质量指纹图

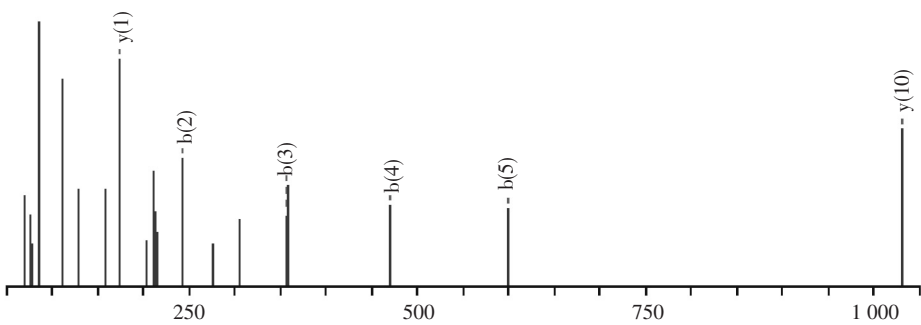


图 3 B05 胰蛋白酶酶解后肽段 NQIDEIVLVGGSTR 的 MS/MS 质谱图

表 1 DY5-CMS 和 DY5-O 1 期差异蛋白的 PMF 数据库搜索鉴定结果

编号	分子质量/ 等电点	覆盖率/ %	蛋白 分数	不育系	保持系	数据库 登录号	匹配蛋白 名称	来源 物种
A02	82 317/6. 33	3	65	+	-	gi 449445941	NADH 脱氢酶	黄瓜
A12	18 113/8. 62	45	75	+	-	gi 115637143	二氢硫辛酰胺脱氢酶	甜菜
A13	39 843/5. 77	78	78	+	-	gi 343410685	ATP 合成酶 β 亚基	刺五加
A37	23 287/6. 16	14	50	+	-	gi 226502202	可溶性无机焦磷酸酶	玉米
A41	19 728/5. 33	32	89	+	-	gi 255577651	ATP 合成酶 D 链	蓖麻
B05	73 775/5. 03	32	174	-	+	gi 3913786	葡萄糖调节蛋白 78	菠菜

注: 编号“ A ”代表 DY5-CMS 1 期, “ B ”代表 DY5-O 1 期; “ + ”代表蛋白表达上调, “ - ”代表蛋白表达下调。

2.2 四分体时期

对甜菜四分体时期花蕾蛋白的差异进行分析, 在不育系中检测到蛋白点 385 个, 保持系中检测到 306 个(如图 4), 检测出 2.0 倍表达量以上

的差异蛋白在 DY5-O 中有 5 个点表达上调, 在 DY5-CMS 中有 11 个点表达上调. 利用 MALDI-TOF-MS 分析去除假阳性点后, 鉴定出 4 个蛋白. 且这 4 个蛋白均在不育系中表达上调(见表 2)。

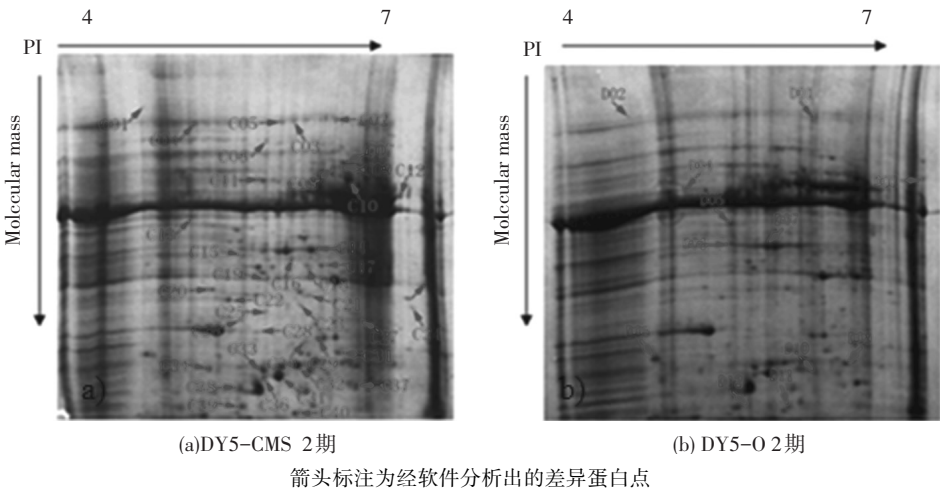


图 4 不育系 DY5-CMS 及其保持系 DY5-O 的 2 期花蕾蛋白 2DE 图谱

表 2 DY5-CMS 和 DY5-O 2 期差异蛋白的 PMF 数据库搜索鉴定结果

编号	分子质量/ 等电点	覆盖率/%	蛋白 分数	不育系	保持系	数据库 登录号	匹配蛋白 名称	来源 物种
C02	109 073/7. 09	14	105	+	-	gi 171854675	假定的顺乌头酸酶	辣椒
C21	39 598/9. 67	14	86	+	-	gi 75282478	半胱氨酸合成酶	菠菜
C23	94 708/5. 93	13	156	+	-	gi 6015065	延长因子 2	甜菜
C32	27 836/5. 41	25	107	+	-	gi 310587	抗坏血酸过氧化物酶	菠菜

注: 编号“C”代表 DY5-CMS 2 期; “+”代表蛋白表达上调, “-”代表蛋白表达下调。

2.3 单核期

对甜菜单核时期花蕾蛋白的差异进行分析, 在不育系中检测到蛋白点 460 个, 保持系中检测到 508 个, 检测出 2.0 倍表达量以上的差异蛋白

总数: 从 3 期中找到 24 个差异点, 其中在 DY5-O 中有 16 个点表达上调, 在 DY5-CMS 中有 8 个点表达上调. 利用 MALDI-TOF-MS 分析去除假阳性点后, 鉴定出 6 个蛋白(见表 3).

表 3 DY5-CMS 和 DY5-O 3 期差异蛋白的 PMF 数据库搜索鉴定结果

编号	分子质量/ 等电点	覆盖率/%	蛋白 分数	不育系	保持系	数据库 登录号	匹配蛋白 名称	来源 物种
E38	14 118/5. 62	11	34	+	-	TRXH1_TOBAC	硫氧还蛋白	烟草
F02	49 986/6. 13	15	47	-	+	gi 34576609	核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/ 加氧酶大亚基	甜菜
F04	42 568/5. 87	9	85	-	+	S17P_SPIOL	景天庚糖-1,7-二磷酸酶	菠菜
F11	35 377/5. 89	26	245	-	+	PSBO_TOBAC	氧增强蛋白 1	烟草
F35	25 718/5. 77	1	16	-	+	gi 261865351	光敏色素 A	甜菜
F65	133 512/6. 65	3	63	-	+	RDR4_ORYSJ	RNA 依赖的 RNA 聚合酶	水稻

注: 编号“E”代表 DY5-CMS 3 期, “F”代表 DY5-O 3 期; “+”代表蛋白表达上调, “-”代表蛋白表达下调。

3 讨 论

3.1 雄蕊原基分化期花蕾育性蛋白差异分析

从甜菜不育系及保持系 1 期花蕾蛋白中鉴定出 6 个差异蛋白, 其中不育系中有 NADH 脱氢酶、二硫辛酰胺脱氢酶、可溶性无机焦磷酸酶、ATP 合成酶的 β 亚基及 ATP 合成酶的 D 链 5 个蛋白表达上调, 这 5 个蛋白均与呼吸和能量代谢有关. 在保持系中只检测出葡萄糖调节蛋白 78 表达上调.

NADH 脱氢酶是线粒体呼吸链的重要组成部

分, 在糖酵解、糖异生、三羧酸循环中起着重要作用. ATP 合成酶是高等植物细胞内最大的酶系之一, 可以合成 ATP 为代谢活动提供能量. 本实验发现的 5 种与能量代谢有关的蛋白均在不育系中表达上调, 推测 ATP 合成酶被水解导致能量供应不足, 促使雄性不育系植物中与能量代谢有关酶的表达量上调. 因此, 推测这些与呼吸及能量代谢有关的蛋白与甜菜的细胞质雄性不育有关.

葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 是内质网上一种重要的分子伴侣, 能阻止内质网内新生肽聚集, 并辅助内质网中新生肽形成正确构象; GRP78 还

是一种钙结合蛋白,维持内质网钙稳态及内环境的稳态.本实验只在甜菜的保持系 DY5-O 中发现了该蛋白,而在不育系 DY5-CMS 中没有发现,推测在不育系中该酶的缺失导致花粉发育过程中的代谢紊乱,最终导致不育现象的产生.

3.2 四分体时期花蕾育性蛋白差异分析

从甜菜 DY5-CMS 及 DY5-O 的四分体时期花蕾蛋白中找到 4 个差异蛋白,分别为顺乌头酸酶、抗坏血酸过氧化物酶、延伸因子 2 及半胱氨酸合成酶.他们与甜菜的雄性不育有关.

顺乌头酸酶 (aconitase, ACO) 是三羧酸循环中能量转化的一个重要控制酶.在介导植物抗病、氧化胁迫和调控细胞死亡方面具有重要作用.张明珠等^[16]发现顺乌头酸酶基因在杀雄剂 SQ-1 诱导小麦雄性不育花药中的表达,在生理型不育花药发育的单核早期 cACO 基因表达水平与同期可育花药相比显著升高,这与本实验的研究结果恰好吻合.

抗坏血酸过氧化物酶是叶绿体中清除 H_2O_2 的主要酶,在盐渍、热休克等逆境条件下均易导致转录水平和活性提高,但在本实验中其对育性生理生化的影响有待进一步研究.

延伸因子 (elongation factor) 是参与蛋白翻译延伸的重要蛋白质.研究发现,延伸因子在原核生物以及植物线粒体和质体等细胞的蛋白质合成延伸阶段发挥着重要的作用,在生长信号传导、抗旱、抗病等方面也有重要作用^[17].

3.3 单核期花蕾育性蛋白差异表达分析

在甜菜的 3 期花蕾中鉴定出的 7 个蛋白中,有 5 个是与植物光合作用有关的蛋白,分别是 H 型硫氧还蛋白 1、核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶 (Rubisco) 大亚基、景天庚糖-1,7-二磷酸酶、氧增强蛋白 1 和光敏色素 A,这些蛋白均在植物的光合作用中起着重要作用.另外 2 个分别是脂肪氧化酶 (LOX) 和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶.

硫氧还蛋白可以通过还原靶蛋白中的二硫键参与细胞的一系列生化反应.在光合器官内,叶绿体铁氧还蛋白/硫氧还蛋白 (Fd/Trx) 参与叶绿体中还原磷酸戊糖途径酶的激活、氧化磷酸戊糖途径酶的暗激活等酶活性的调节^[18].本实验表明硫氧还蛋白在甜菜不育系 3 期花蕾中表达上调,说明在甜菜不育系的花药发育至此期该酶起到一定的作用.

核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 能催化光合作用的二氧化碳固定反应.该类蛋白的差异表达普遍存在于植物雄性不育系

和保持系或不育系和转换系之间,在水稻、萝卜、小麦、甘蓝、番茄、烟草等植物雄性不育中均检测到 Rubisco 的功能缺陷或下调^[19-20].本实验在甜菜保持系的花蕾中也检测到这种蛋白,而在不育系中缺失.推测 Rubisco 在不育系中缺失影响发育过程中糖和蛋白质含量,而糖和蛋白质代谢的失调与不育系花药中小孢子的败育有关.花粉败育的同时营养代谢紊乱,合成受阻,分解加剧,影响雄性器官的发育,最终导致不育.

景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶 (SBPase) 在植物光合作用卡尔文循环过程中控制着碳的流入和再生,对核酮糖-1,5-二磷酸的再生也起着重要作用.SBPase 活性的改变会影响植物的生殖生长,如表现出开花延迟,开花数减少的现象^[21].本实验发现在甜菜的保持系中 SBPase 的表达上调,推测不育系中 SBPase 缺失影响了核酮糖-1,5-二磷酸的再生,进而影响花粉的败育.

氧增强蛋白 1 (oxygen-evolving enhancer protein 1, OEE1) 是由核基因锰簇稳定外周蛋白 PsbO 基因编码的定位于叶绿体上的蛋白.在甜菜不育系的单核时期花蕾中该蛋白表达下调,其作用机理尚不明确.

光敏色素是一种色素蛋白复合体,可以调节开花,还能控制性别表达和育性的转变.光敏核不育水稻在长日照下雄性不育,在短日照下可育.光敏色素通过调节光周期参与光敏水稻的雄性器官发育和育性转变,本实验在保持系中检测到的光敏色素 A 在不育系中表达下调或缺失,推测光敏色素 A 是与雄性不育有关的蛋白之一.

RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RDR) 通过基因沉默途径参与植物的生长发育调节、逆境应答以及表观遗传修饰等生物学过程.本实验发现 RDR 在不育系甜菜的 3 期花蕾中表达下调或缺失,推测不育系中 RDR 的表达下调或缺失可能对甜菜不育系花粉败育后期有影响.

4 结 论

1) 雄蕊原基分化期,找到 6 个与雄性不育有关的蛋白,其中 5 个蛋白还与能量和呼吸代谢有关,即 NADH 脱氢酶、二硫辛酰胺脱氢酶、可溶性无机焦磷酸酶、ATP 合成酶的 β 亚基和 ATP 合成酶 D 链.这 5 个蛋白均在不育系中表达上调,只有一个在保持系中表达上调的蛋白是葡萄糖调节蛋白 78.

2) 四分体时期,分别是顺乌头酸酶、抗坏血酸过氧化物酶、延伸因子 2 及半胱氨酸合成酶可

能与雄性不育有关.这些蛋白均在不育系中表达上调.

3)单核时期,筛选出 6 个可能与育性有关的蛋白.其中只有硫氧还蛋白在不育系中表达上调,其余 5 个蛋白均在保持系中表达上调.

参考文献

- [1] CHENG D Y, KITAZAKI K, XU D C, et al. The distribution of normal and male-sterile cytoplasm in Chinese sugar-beet germplasm[J]. Euphytica, 2009, 165:343-351.
- [2] CARRETERO-PAULET L, GALSTYAN A, ROIG-VILLANOVA I, et al. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss and algae[J]. Plant Physiol, 2010, 153:1398-1412.
- [3] DAI S, CHEN T, CHONG K, et al. Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated Oryza sativa pollen[J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6:207-230.
- [4] XU K, CAO M J, ZHU Y G, et al. Differential expression of mitochondrial proteins between C-type cytoplasmic male sterility line C48-2 and its maintainer line in maize[J]. Acta Agron Sin, 2008, 34(2):232-237.
- [5] NIJAT I, TURSUN K, WEINMAN J J, et al. Characterization of rice anther proteins expressed at the young microspore stage[J]. Proteomics, 2001, 1:1149-1161.
- [6] WU R, DEPHOURE N, HAAS W, et al. Correct interpretation of comprehensive phosphorylation dynamics requires normalization by protein expression changes[J]. Mol Cell Proteomics, 2011, 10: M111009654.
- [7] NIJAT I, TURSUN K, ROLFE B G, et al. Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers[J]. Proteomics, 2004, 4:1873-1882.
- [8] 曾维英, 杨守萍, 盖钧镒, 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.
- [9] 文李, 刘盖, 张再君, 等. 红莲型水稻细胞质雄性不育花粉总蛋白质初步比较分析[J]. 遗传, 2007, 25(2):112-117.
- [10] 谢锦云, 李小兰, 陈平, 等. 温敏核不育水稻花药蛋白质组的初步分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(2):215-221.
- [11] 陈蕊红, 叶景秀, 张改生, 等. 小麦质核互作型雄性不育系及其保持系花药差异蛋白质组学分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(4):431-440.
- [12] SHEORANA I S, ANDREW R S R, DOUGLAS J H O, et al. Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (*Solanum lycopersicum*): a proteomic analysis[J]. Proteomics, 2009, 9: 624-636.
- [13] YAMAMOTO M P, SHINADA H, ONODERA Y, et al. A male sterility-associated mitochondrial protein in wild beets causes pollen disruption in transgenic plants[J]. Plant J, 2008(6):1027-1036.
- [14] YAMAMOTO M P, KUBO T, MIKAMI T. The 5'-leader sequence of sugar beet mitochondrial atp6 encodes a novel polypeptide that is characteristic of Owen cytoplasmic male sterility[J]. Mol Gen Genomics, 2005, 273:342-349.
- [15] YI F Y, SHI F L, LONG R C, et al. Comparative proteomic analysis of bud proteins of alfalfa male sterile and fertile plants at bud emergence stage[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2013, 33(10):1964-1971.
- [16] 张明珠, 袁蕾, 王俊生, 等. 顺乌头酸酶基因在杀雄剂 SQ-1 诱导小麦雄性不育花药中的表达分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(8):740-748.
- [17] FU J M, IVANA M I, VARA P P V. Roles of protein synthesis elongation factor EF-Tu in heat tolerance in plants[J]. Journal of Botany, 2012(10):835-836.
- [18] YU Y, ZHANG X, ZHANG Y, et al. Isolation of the cDNA fragment of watermelon genic malesterility related genes using DDRT2PCR[J]. Journal of Northwest A & F University (Nat Sci Ed), 2008, 36(11):163-175.
- [19] 廖英明. 红麻蛋白质组 2-DE 建立及不育系和保持系差异蛋白分析[D]. 福建: 福建农林大学, 2010.
- [20] 刘祚昌, 李继耕, 罗会馨, 等. 二磷酸核酮糖羧化酶与细胞质雄性不育性的研究[J]. 遗传学报, 1983, 10(1):36-42.
- [21] YUAN C Z, HAN X J, LI Y Q, et al. Genetic transformation and biological function analysis of the sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase gene from mulberry[J]. Science of Sericulture, 2013, 39(3):413-0419.

(编辑 刘 彤)