



棉花恢复系中含有 26S rRNA 序列 的 *GH18Rorf392* 基因克隆

吴巧雯^{1,2}, 宋洋¹, 张锐¹, 王远¹, 郭三堆^{1*}

(1. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081;

2. 北京人民警察学院, 北京 102202)

摘要: 以 Y18R×P30A 杂交 F₁ 代自交材料播种后根据雄蕊形态学判断其育性, 然后分别提取可育和不育材料现蕾 3~5 d 的幼蕾总 RNA。通过抑制差减杂交的方法获得来自棉花恢复系的 EST 序列之后, 以该 EST 序列设计引物再做 5' 和 3' RACE, 从而获得其全长 cDNA 序列。由于该基因来源于陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 恢复系 Y18R, 并且编码 392 个氨基酸的蛋白质, 因此, 将其命名为 *GH18Rorf392*。该基因的 5' 端是一个全新的序列, 3' 端含有 26S rRNA 序列。该基因可能对研究棉花育性相关功能有帮助。

关键词: 棉花; 恢复系; 抑制差减杂交; 细胞质雄性不育; 育性恢复

中图分类号: S562.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2008)05-0323-07

Cloning of the Gene *GH18Rorf392* Containing 26S rRNA Sequence from Cotton Restorer line

WU Qiao-wen, SONG Yang, ZHANG Rui, WANG Yuan, GUO San-wei*

(1. Biotechnology Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Beijing People's Police College, Beijing 102202, China)

Abstract: Y18R×P30A hybrid F₁ generation then inbred, so judge the fertility according to stamen morphological character. Total RNA were extracted from young buds of 3~5 days from fertile and sterile cotton, respectively. EST sequence from cotton restorer line was obtained through suppression subtractive hybridization. Designing primers according to the EST sequence, then doing rapid amplification cDNA ends, so full length cDNA sequence was obtained. The gene was named by *GH18Rorf392* because it came from *Gossypium hirsutum* restorer line Y18R and codes 392 amino acids. The 5' end of *GH18Rorf392* is a new sequence and its 3' end contains 26S rRNA partial sequence. This gene can be used to study cotton fertility associated function.

Key words: cotton restorer line; SSH; RACE; CMS; fertility restore

植物细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, 简称 CMS) 是一种广泛存在于高等植物中的雄蕊不能正常授粉而雌蕊功能正常的现象, 属于母系遗传。而恢复系细胞核中的恢复基因 (Restorer of fertility, *Rf*) 能抑制 CMS 的表型, 具有使不育恢复为可育的功能。因此, 利用不育系和恢复系在实现杂交种种子大规模生产中具有很大的应用价值^[1]。2005 年中国农科院生物技术研究所的“转抗虫基因三系杂交棉分子育种体

系”成果通过了国家鉴定, 成功地创建了高产量、高纯度、高效率、大规模、低成本、能够直接应用的转抗虫基因三系杂交棉常规育种与分子育种相结合的新体系。在此基础上, 本实验运用抑制差减杂交技术, 研究了棉花幼蕾发育早期育性恢复相关基因。

抑制差减杂交是新近发展起来的一种差减杂交技术, 用于分离两个 mRNA 群体间差异表达的基因^[2]。其依据的技术主要有两点: (1) 差减杂

交;(2)抑制 PCR。经抑制差减杂交后的 cDNA 群体不仅富集了差异表达基因,而且目的基因间丰度的差异经过均衡化作用已基本消除。换言之,差减后的 cDNA 群体为丰度一致的目的基因群体。因此,SSH 技术克服了以往差减杂交方法“高丰度易得,低丰度难求”的技术限制,两个待比较的群体间差异表达的所有目的基因(高、中、低丰度)都能得到有效克隆。在动物研究领域该技术已成功用于分离不同器官组织之间、个体不同发育阶段以及受外界因子作用而差异表达的基因^[2~5]。本实验将 SSH 技术引入棉花育性恢复相关基因的研究领域,以恢复系与不育系杂交后代自交分离的不育材料为对照,以可育材料为目标群体,研究在棉花幼蕾发育早期育性恢复相关基因。

本文是通过抑制差减杂交的方法获得来自棉花恢复系的 EST 序列之后,以该 EST 序列设计引物再做 5'和 3'RACE,从而获得其全长 cDNA 序列。该基因的 3'端含有 26S rRNA 序列,5'端是一个全新的序列。由于该基因来源于陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 恢复系 Y18R,并且编码 392 个氨基酸的蛋白质,因此将其命名为 GH18Rorf392。

1 材料和方法

1.1 材料

棉花品种为中国农科院生物技术研究所培育的 Y18R×P30A 杂交 F₁ 代自交 F₂ 代材料。F₁ 代自交材料播种后根据雄蕊形态学判断其育性,然后分别摘取可育和不育材料现蕾 3~5 d 的幼蕾。用解剖刀切去苞叶,液氮速冻幼蕾,-70℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 仪器、试剂的处理。研钵及研棒、药匙等仪器在 180~200℃ 烘 6 h 左右。玻璃器皿和塑料制品使用前必须于 180℃ 烤 8 h 或用氯仿冲洗。用烤过的药匙称取试剂。溶液用 0.1% DEPC 于 37℃ 至少处理 12 h,在 151 bf·h⁻¹ (1.034×10⁵ Pa) 的高压下蒸气灭菌 15 min。RNA 操作过程中,都应戴一次性手套,并且应勤换手套。

1.2.2 热硼酸/蛋白酶 K 法。参见文献[6],并进行了部分修改。整个流程为:将 0.2 g 冷冻或新鲜的叶片或幼蕾放入预冷的研钵中,研磨成粉状,倒入 1.5 mL 微量离心管中,加入 1 mL 预热至 80℃ 的基本提取液 (200 mmol·L⁻¹ NaBO₃·10H₂O, 30 mmol·L⁻¹ EGTA, 1% (w/v) SDS, 1% 脱氧胆酸钠, 2% (w/v) PVP, 0.5% Nonidet-40, pH 9.0), 10 μL DTT 贮备液和 25 μL 蛋白酶

K 贮备液混匀; 42℃ 100 r·min⁻¹ 温和摇动 1.5 h; 每管加入 80 μL 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液, 冰浴 1 h; 12000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 将上清移入一个新管中, 加入 1/3 体积 8 mol·L⁻¹ LiCl, 混匀, 冰上过夜沉淀; 12000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃上清, 用 2 mol·L⁻¹ LiCl (冰预冷) 洗沉淀 2~3 次, 直到上清近乎无色; 重悬 LiCl-RNA 于 400 μL 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5) 中, 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 转移上清至新离心管中; 加入 1/10 体积的 2 mol·L⁻¹ KAc (pH 5.5), 混匀, 冰浴 15 min 沉淀; 离心除去盐不溶物质 (上清中含有 RNA); 用 2.5 倍体积的无水乙醇 -20℃ 沉淀过夜或 -70℃ 沉淀 2~3 h; 用 70% 冷乙醇洗涤 RNA 沉淀, 真空冷冻快速干燥, 溶于经 DEPC 处理过的水或 TE 缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0) 中; 根据分光光度计在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值计算 RNA 产率与质量。

1.2.3 抑制差减杂交法。SSH 按照 Clontech PCR-Select™ cDNA Subtractive Kit 说明书进行操作。以 Y18×P30A 杂交 F₁ 代自交 F₂ 代中可育材料 3~5 d 的幼蕾为 Tester, 不育材料 3~5 d 的幼蕾为 Driver, 进行正向差减杂交, 用 T/A 克隆法构建差减 cDNA 文库: 将 PCR 扩增后的正向差减 cDNA 片段回收, 与 pGM-T 载体连接, 16℃ 过夜, 将连接体系转化受体菌 DH5α, 于 X-gal/IPTG Amp 琼脂平板上挑取白色克隆, 点种于盛有液体 LB 培养基的 96 孔板中, 培养过夜, 加 15% 甘油, 置于液氮中速冻, -70℃ 保存菌种。然后采用自动测序法对差减 cDNA 文库进行测序。

1.2.4 RT-PCR。根据所得差减序列设计一对引物, 取抽提的 Y18、P30A、F₂ 可育与不育材料 3~5 d 幼蕾的总 RNA 各 1 μg, 用 Promega 的 DNase I 消化后, 再用 TaKaRa 公司的 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 进行 RT-PCR 验证。

1.2.5 5'和 3'RACE。RACE 和 PCR 产物回收与连接转化按照以下步骤进行操作。用 SSH 片段 (GSP 反向引物) 与 GeneRacer™ RNA Oligo (5'RACE 引物) 序列组成引物对 (表 1), 以 Y18R×P30A 杂交 F₁ 代自交 F₂ 代可育和不育材料现蕾 3~5 d 的幼蕾总 RNA 为模板进行棉花育性恢复相关基因 5'RACE; 在用 SSH 片段 (GSP 正向引物) 与 Oligo(dT18) (3'RACE 引物) 组成引物对 (序列见表 1), 以 Y18R×P30A 杂交 F₁ 代自交 F₂ 代可育和不育材料现蕾 3~5 d 的幼蕾总 RNA 为模板进行棉花育性恢复相关基因 3'RACE。分别将 5'和 3'RACE 片段连接到 pCR4-TOPO 载

体上,转化大肠杆菌 DH5 α -T1 感受态细胞,50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那筛选。将获得的转化子用 Pst I 和 Not I 双酶切鉴定插入条带的大小。将插入有目的片段的载体送去测序以获得棉花育性恢复相关基因 5'端 cDNA 序列,利用 GenBank 的 blast 软件进行核苷酸序列查询。将含有 5'RACE 序列的载体命名为 pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 5',将含有 3'RACE 序列的载体命名为 pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 3'。

1.2.6 通过设计引物 PCR 拼接全长 cDNA。为了获得含有基因完整全长 cDNA 序列的载体,因此设计两对引物:5'端正向和 5'端反向拼接,3'端正向拼接和 3'端反向,以 pCR4-TOPO-

GH18Rorf392 5'为模板,以 5'端正向和 5'端反向拼接为一对引物进行 PCR;以 pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 3'为模板,以 3'端正向拼接和 3'端反向为一对引物进行 PCR。

回收扩增片段、再扩增:分别切下第一次扩增到的含有两个片段的胶片,分别过柱回收,将这两个回收的第一次扩增产物片段等量混合后作为模板,以 5'端正向和 3'端反向为一对引物做第二次 PCR。

回收完整基因片段、连接并转化:PCR 产物回收与连接转化按照参考文献[8]的步骤进行操作。将获得的转化子用 Pst I 和 Not I 双酶切鉴定以确定插入条带的大小。

表 1 PCR 引物表
Table 1 PCR primers

反应类别	引物类别	引物序列
5'RACE 巢式	正向引物	GGCACTGACATGGACTGAAGGAGTA
	反向引物	CGTGAAAGCGTGGCCTATCGATCCT
3'RACE 巢式	正向引物	CACGACGGTCTAATCCCAGCTCACG
	反向引物	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG
5'端拼接	正向引物	CTGAAGGAGTGGGAAAGGGT
	反向引物	GGATTAGACCGTCGTGGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTAG
3'端拼接	正向引物	AGTACCTCGGCCGCGACACGCCACGACGGTCTAATCCCA
	反向引物	AGAAATTCAACCAAGCGCGG
5'和 3'RACE	正向引物	CACGACGGTCTAATCCCAGCTCACG
	反向引物	CGTGAAAGCGTGGCCTATCGATCCT

2 结果与分析

为了克隆得到棉花幼蕾发育早期育性恢复相关基因,以 Y18R \times P30A 杂交 F₁ 代自交 F₂ 代作为材料。F₁ 代自交材料播种后根据雄蕊形态学判

断其育性^[7-8],然后分别摘取可育和不育材料现蕾 3~5 d 的幼蕾(图 1)。



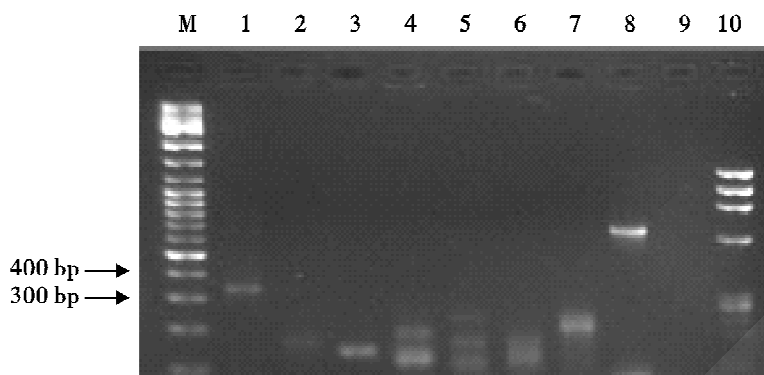
图 1 棉花 F₂ 代可育和不育材料雄蕊形态学特征图

Fig. 1 Stamen morphological profile of cotton F₂ fertility and sterility

断其育性,运用 SSH 技术,差减得到 300 bp 左右的正向差减序列(图 2),用 T/A 克隆法得到了 173 个独立克隆的差减 cDNA 文库。测序结果主要是两种序列,这两种序列基本平均分配,个别为空载体序列。对这两个序列进行分析发现,其为反向

互补序列。该片段大小为 340 bp。

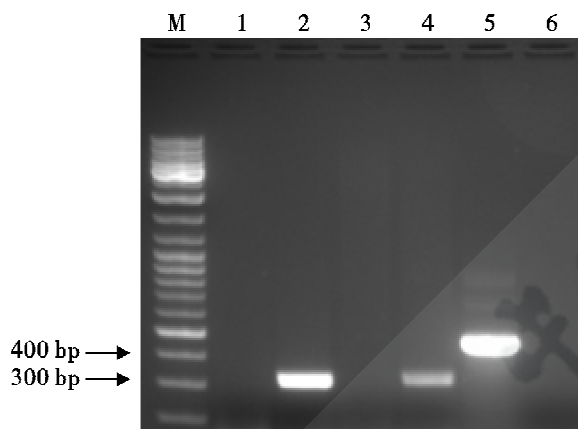
RT-PCR 的结果(图 3)表明,Y18R 和 F₂ 可育材料中扩增出 300 bp 的特异片段,而 P30A 与 F₂ 不育材料中则没有该片段。从而验证了所得到的差减序列的特异性。



M: DNA 分子量标记; 1: 正向差减实验 cDNA; 2: 未被差减的 tester 对照; 3: 反向差减实验 cDNA; 4: 用于反向差减的未被差减的 tester 对照; 5: 差减对照 cDNA; 6: 用于对照差减的未被差减的 tester 对照; 7: PCR 对照差减 cDNA; 8: PCR 阳性对照; 9: PCR 阴性对照; 10: ϕ X174/HaeIII

图 2 抑制差减杂交片段电泳图谱

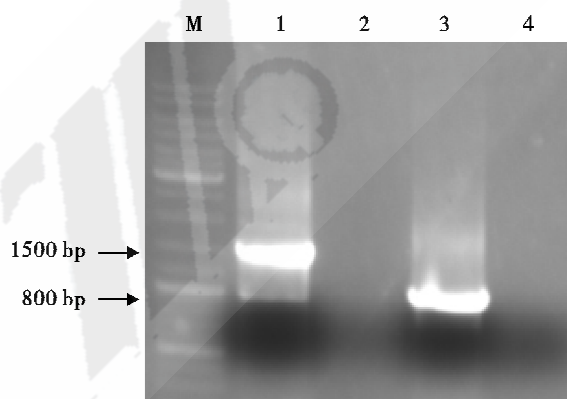
Fig. 2 Electrophoresis profile of SSH fragments



M: DNA 分子量标记; 1: F_2 代不育材料; 2: F_2 代可育材料; 3: P30A; 4: Y18R; 5: RT-PCR 阳性对照; 6: RT-PCR 阴性对照

图 3 RT-PCR 电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis profile of RT-PCR



M: DNA 分子量标记; 1: F_2 代可育材料 5' RACE; 2: F_2 代不育材料 5' RACE; 3: F_2 代可育材料 3' RACE; 4: F_2 代不育材料 3' RACE

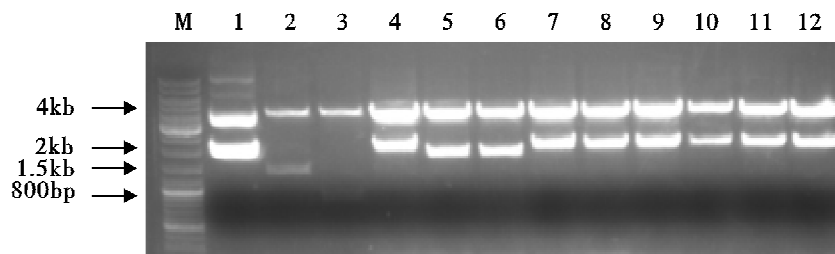
图 4 RACE 电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis profile of RACE

5' RACE 的结果是从棉花 F_2 代可育幼蕾总 RNA 中扩增到 1500 bp 的特异条带(图 4)。将获得的转化子用 Pst I 和 Not I 双酶切鉴定, 确为插入 1500 bp 条带(图 5)。测序后获得 *GH18Rorf392* 基因 5' 端 cDNA 序列, 利用 GenBank 的 blast 软件进行核苷酸序列查询, 发现该 5' 端 cDNA 序列为新序列。将含有该序列的载体命名为 pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 5'。

3' RACE 的结果是棉花 F_2 代可育幼蕾总 RNA 中扩增到 800 bp 的特异条带(图 4)。将获得的转化子用 Pst I 和 Not I 双酶切鉴定, 确为插入 800 bp 条带(图 5)。测序后获得棉花育性恢复相关基因 3' 端 cDNA 序列, 利用 GenBank 的 blast 软件进行核苷酸序列查询, 发现该 3' 端 cDNA 序列的主体部分是 26S 核糖体 RNA 的部分序列, 并且具有 98% 以上的同源性。将含有该序列的载体命名为 pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 3'。

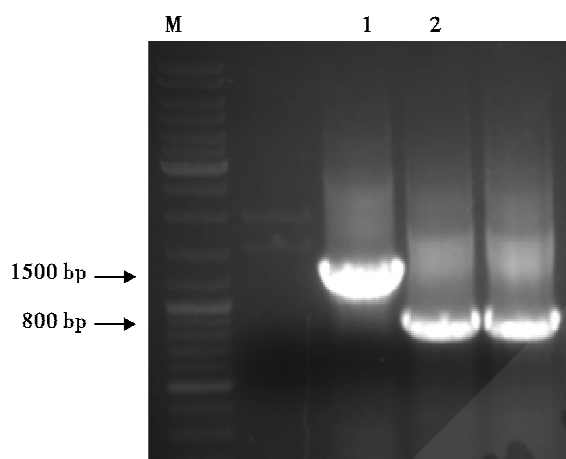
以 pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 5' 为模板, 以 5' 端正向和 5' 端反向拼接为一对引物进行 PCR; 得到 1200 bp 的片段(图 6)。以 pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 3' 为模板, 以 3' 端正向拼接和 3' 端反向为一对引物进行 PCR; 扩增到 800 bp 的片段(图 6)。以回收到的含有 1200 bp 和 800 bp 片段等量混合后作为模板, 以 5' 端正向和 3' 端反向为一对引物做第二次 PCR, 通过琼脂糖凝胶电泳检测到最终连接到一起的完整基因序列(2039 bp, 图 7)。将获得的转化子用 Pst I 和 Not I 双酶切鉴定, 确为插入 2000 bp 条带(图 5)。



M:DNA 分子量标记;1,4~12:pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* / Pst I + Not I ; 2:pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 5'/Pst I +Not I ; 3:pCR4-TOPO-*GH18Rorf392* 3'/ Pst I +Not I

图 5 双酶切连接转化质粒电泳图谱

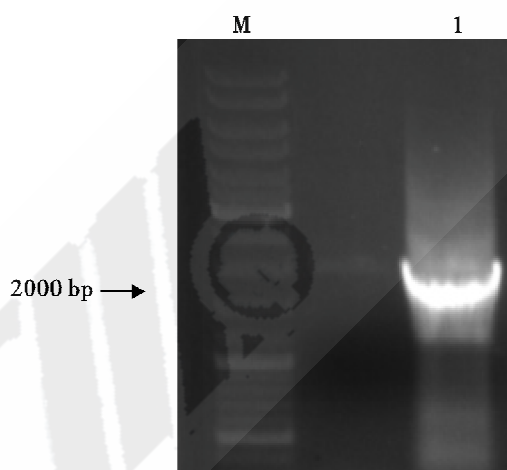
Fig. 5 Electrophoresis profile of ligation transformant plasmid digested by two restriction endonucleases



M: 分子量标记; 1;5'端 PCR 产物;2;3'端 PCR 产物

图 6 拼接全长 cDNA 的 PCR 电泳图谱

Fig. 6 Electrophoresis profile of PCR for splicing cDNA full length



M: 分子量标记; 1:全长 PCR 产物

图 7 拼接好的全长 cDNA 的 PCR 电泳图谱

Fig. 7 Electrophoresis profile of full length cDNA PCR by splicing

3 结论和讨论

克隆恢复基因是一项重要且颇具挑战性的工作,这一方面是由于没有同源序列和蛋白序列的

资料,而常用的一些基因克隆策略难以运用;另一方面是因为其基因表型需要通过胞质不育因子相互作用才能显现出来,这使突变体的分析更加复杂化,因此,克隆恢复基因必须在技术手段上进行大胆尝试。本文通过以 P30A×Y18R 杂交种 F₂ 代为材料,根据雄蕊形态学取材,将可育与不育材料的幼蕾 mRNA 反转录出 cDNA 后,分别作为 tester 和 driver,通过抑制差减杂交的方法,扣除得到差别基因的片段,继而以该 EST 序列设计引物再做 5'和 3'RACE,从而获得其全长 cDNA 序列。该基因的 5'端是一个全新的序列,3'端含有 26S rRNA 序列。而在棉花这样的高等植物中只有线粒体等存在于细胞质中的细胞器才有 26S 核糖体 RNA 基因。因此,推断该基因也许能够与线粒体或叶绿体等细胞器中的核糖体发生相互作用,而目前最多报道的与不育细胞质紧密相关的是线粒体基因的突变^[9]。

到目前为止,已克隆的植物 *Rf* 基因有玉米 (*Zea mays* L.) 的 *Rf2* 基因^[10]、矮牵牛 (*Petunia hybrida* L.) 的 *Rf* 基因、萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 的 *Rfo* 和 *Rfk* 基因^[11] 以及水稻 (*Oryza sativa* L.) 的 *Rf1* 基因^[12] 等。在众多尝试中,玉米 T 型 CMS 恢复基因 *Rf2* 是最早被克隆成功的范例。Cui 等^[8] 应用转座子标签法在 *Rf2/rf2* 杂交植株中筛选出不育株,以插入点旁邻片段为探针筛选得到全长的 *Rf2* cDNA 克隆,经序列分析和同源性比较证明 *Rf2* 是核编码的线粒体定位的乙醛脱氢酶基因 (aldehyde dehydrogenase, ALDH)。Bentolila 等^[13] 在精细定位群体中克隆出与 *Rf* 共分离的一个 AFLP 标记,并用该标记从矮牵牛恢复系基因组的 BIBAC 文库鉴定出与 *Rf* 共分离的克隆,对该克隆进行测序和分析,鉴定出具有线粒体靶向信号且含 PPR (pentatricopeptide repeat, PPR) 基序的两个相互毗邻的 ORF。Brown 等^[14] 和 Desloir 等^[15] 几乎同时发表文章报道他们克隆出了萝卜的 *Rfo* 基因。Desloir

等^[15]是根据萝卜与拟南芥的微同线性 (microsynteny), 利用图位克隆的方法将萝卜 *Ogura* CMS 的 *Rfo* 基因定位在一个 15 kb 的 DNA 片段上。对该 DNA 片段测序的结果表明, *Rfo* 基因是 PPR 基因家族的一个成员。Brown 等^[14]采用和 Desloir 等同样的方法, 也克隆了萝卜 *Ogu* 的恢复基因 *Rfo*。结合 5' 和 3' RACE 鉴定出 *Rfo* 基因编码一个 687 个氨基酸的蛋白质; 在该基因编码的蛋白质中含有线粒体定位前导序列 (mitochondrial targeting pre-sequence) 和 16 个 PPR 基元序列 (motif)。Imai 等^[16]报道的克隆出的萝卜 *Kos* CMS *Rfk1* 基因也含有 16 次重复的 PPR 基元序列, 编码一个 687 个氨基酸的蛋白。运用图位克隆法分离水稻恢复基因 *Rf-1* 已有三个独立研究报道。Kazama 等^[17]最早分离了 *Rf-1* 的候选基因 PPR8-1。Komori 等^[12]鉴定出的 *Rf-1* 基因, 其编码一个含有 16 次重复的 35 个氨基酸 PPR 基元的线粒体靶向蛋白。Akagi 等^[18]克隆出 Bt 型 CMS 的候选恢复基因也编码以线粒体为目标的 PPR 蛋白。

尽管到目前为止所克隆得到的恢复基因以 PPR 蛋白居多, 但还未见棉花的恢复基因也是 PPR 蛋白的报道。由于棉花核恢复基因在 CMS 中所起的作用是不容忽视的, 在 *Rf* 基因存在的核背景下, 与 CMS 相关的线粒体 DNA 的突变表型可得到有效校正, 花粉败育现象得到抑制, 因而育性得以恢复。这就显示只有在真正了解恢复基因与线粒体 CMS 相关基因相互作用的情况下, 才能完整地解释 CMS 分子机理, 并进一步促进 CMS 在农业上的应用^[19]。然而, 有关细胞质雄性不育线粒体基因组的研究已有很多论述, 相比之下涉及核恢复基因的工作相当零散, 其中有一部分是在研究不育线粒体基因组时附带提及的。归纳起来有关恢复基因的工作主要包括两个方面: 一是对比不育系在引入恢复基因前后, 线粒体不育基因表达样式的差异, 从而间接地探讨恢复基因调控线粒体 CMS 基因表达的机理; 二是直接探讨核恢复基因的分子本质, 尝试克隆恢复基因, 以解释其恢复育性的功能。正好本文克隆得到的 *GH18Rorf392* 基因其 3' 端含有 26S rRNA 序列 (该基因序列已申请专利, 申请号: 200710110277.5), 由此设想本文克隆得到的 *GH18Rorf392* 基因也许与育性恢复有关, 这有待于以后做进一步的验证。如果这方面的工作取得新的突破, 将为棉花杂种优势利用中不育与育性恢复上核质互作方面的机理研究与运用打开新的局面。

参考文献:

- [1] 郭旺珍, 张天真. 棉花胞质雄性不育育性恢复基因的 RAPD-PCR 标记筛选[J]. 科学通报, 1997, 42(24): 2645-2647.
- [2] DIATCHENKO L, Chrislau Y E, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differential regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:6025-6030.
- [3] KUANG W W, Thompson D A, Hoch R V, et al. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26:1116-1123.
- [4] GURSKAYA N G, Diatchenko L, Chenchik A, et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate[J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91-95.
- [5] VON STEIN O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 2598-2602.
- [6] WAN Ching-yi, Wilkin T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Anal Biochem, 1994, 223:7-12.
- [7] 张天真. 陆地棉 1355A 和 104-7A 不育系的细胞学研究[J]. 棉花学报, 1995, 7(2): 73-75.
- [8] 姚长兵, 胡绍安, 王春英, 等. 棉花细胞质雄性不育小孢子母细胞败育的细胞学研究[J]. 棉花学报, 1994, 6(增刊): 25-27.
- [9] SCHNABLE P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration[J]. Trends Plant Sci, 1999, 3: 175-180.
- [10] CUI Xiang-qin, Wise R P, Schnable P S. The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize[J]. Science, 1996, 272: 1334-1336.
- [11] KOIZUKA N, Imai R, Fujimoto H, et al. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687 that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish[J]. Plant J, 2003, 34: 407-415.
- [12] KOMORI T, Ohta S, Murai N, et al. Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant J, 2004, 37: 315-325.
- [13] BENTOLILA S, Alfonso A A, Hanson M R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 10887-10892.
- [14] BROWN G G, Formanova N, Jin H, et al. The radish *Rfo* restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopep-

- tide repeats[J]. *Plant J*, 2003, 35: 262-272.
- [15] DESLOIRE S, Gherbi H, Laloui W, et al. Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family[J]. *EMBO Rep*, 2003, 4: 588-594.
- [16] IMAI R, Koizuka N, Fujimoto H, et al. Delimitation of the fertility restorer locus *Rfk1* to a 43-kb contig in kosen radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *Mol Gen Genet*, 2003, 269: 388-394.
- [17] KAZAMA T, Toriyama K. A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice [J]. *FEBS Lett*, 2003, 544: 99-102.
- [18] AKAGI H, Nakamura A, Yokozeki-misono Y, et al. Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondrial-targeting PPR protein [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1449-1457.
- [19] 徐秉芳. 核编码的育性恢复基因[J]. *植物生理学通讯*, 2000, 36(6): 573-580. ●

中国棉花杂志社
China Cotton Magazine House

