

## 研究报告 Research Report

# 细胞质雄性不育烟草 *orfB* 基因的 PCR 扩增与序列分析

陶瑶<sup>1</sup>, 王瑜<sup>1,3</sup>, 吴凌敏<sup>1</sup>, 谢丽娟<sup>1</sup>, 聂亚平<sup>1</sup>, 钟思荣<sup>1</sup>, 周玮<sup>2</sup>, 王建革<sup>4</sup>, 刘齐元<sup>1</sup>

1 江西农业大学农学院/作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室/江西省作物生理生态与遗传育种重点实验室, 南昌, 330045

2 湖南农业大学生物安全科学技术学院/植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 长沙, 410128

3 贵州省黔东南州农业委员会, 兴义, 562400

4 江西农业大学园林与艺术学院, 南昌, 330045

✉ 通讯作者, qiyuanl@126.com   ✉ 作者

计算分子生物学, 2016 年, 第 5 卷, 第 6 篇   doi: 10.5376/cmb.cn.2015.05.0006

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2016 年第 35 卷第 6 期 1464-1470 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

陶瑶等, 2016, 细胞质雄性不育烟草 *orfB* 基因的 PCR 扩增与序列分析, 计算分子生物学(online), 5(6): 1-7 (doi: 10.5376/cmb.cn.2014.05.0006)

引用格式(英文):

Tao et al., 2016, PCR amplification and sequence analysis of CMS *orfB* gene in tobacco, Computational Molecular Biology (online), 5(6): 1-7 (doi: 10.5376/cmb.cn.2014.05.0006)

**摘要** 为探究 ATP 合酶 F0 部分的 *orfB* 基因与植物雄性不育性的关系, 本实验以 3 个烟草雄性不育系(MS 中烟 90、MS 云烟 85 和 MSK326)及其同型保持系为供试材料, 提取其花蕾总 DNA, 利用 PCR 特异引物扩增目的基因 *orfB*, 并对目的基因进行测序和对比分析。结果显示: 3 个保持系的 *orfB* 基因序列完全一致, 且与 GenBank 数据库中收录的烟草 *orfB* 基因序列吻合; 3 个不育系的目的基因序列也完全一致, 但与保持系相比, 不育系目的基因在第 363 碱基位点发生 A→C 的突变, 导致该位点密码子编码的 Lue(亮氨酸)变异为 Phe(苯丙氨酸)。因此推测烟草的 *orfB* 基因可能与其雄性不育性的形成有关。

**关键词** 烟草, 雄性不育性, *orfB* 基因, 序列分析

## PCR amplification and sequence analysis of CMS *orfB* gene in tobacco

Tao Yao<sup>1</sup>, Wang Yu<sup>1,3</sup>, Wu Linmin<sup>1</sup>, Xie Lijuan<sup>1</sup>, Nie Yaping<sup>1</sup>, Zhong Sirong<sup>1</sup>, Zhou Wei<sup>2</sup>, Wang Jiange<sup>4</sup>, Liu Qiyuan<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education, Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding of Jiangxi Province, College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, 330045

2 Agricultural committee of Guizhou province Qianxinanzhou, Xingyi 562400

3 Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128

4 College of Landscape Architecture and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, 330045

✉ Corresponding author, qiyuanl@126.com   ✉ Authors

**Abstract** To research the correlation between subunit gene *orfB* of F0-ATPase and plant male sterility, three different species of tobacco male sterility lines(MS Zhongyan90, MS Yunyan85, MS K326) and their corresponding maintainer lines were worked as tested materials in the experiment. Extracting the total DNA of the bud, the experiment used PCR specific primer to amplify target gene *orfB*. What's more, sequencing and contrastive analysis were carried out to the target gene. The results showed: *orfB* gene sequences of maintainer lines were on all fours in the three tested materials, and they were consistent with *orfB* gene sequences of tobacco that were included in the GenBank database. As well, target gene sequences of male sterility lines were in full accord, but at

收稿日期: 2016 年 08 月 10 日

接受日期: 2016 年 08 月 10 日

发表日期: 2016 年 08 月 10 日

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31260350; 31301388)和江西省教育厅科技计划项目(GJJ13275)共同资助。

the side of the maintainer lines, the 363 base sites in *orfB* gene sequence of male sterility lines were changed, in particular, the change of base A→C site turned Lue (leccine) that was encoded by the codon in 363 base site into Phe( phenylalanine). Therefore, it can infer that tobacco *orfB* gene may be connected with the form of cytoplasmic male sterility in tobacco.

**Keyword** Tobacco,Cytoplasmic male sterility,orfB gene,Sequence analysis

大量研究表明,不育和可育胞质的线粒体是有差别的,随着人们对植物生殖发育的分子生物学和植物雄性不育机理的深入研究使人们确信细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)与线粒体基因组的突变和重组有着密切的关系,且线粒体酶活性的异常与雄性不育现象有着密切关系(巴青松等, 2015)。而线粒体 ATP 合酶是生物体内进行光合磷酸化和氧化磷酸化反应时合成 ATP 的关键酶,是 mtDNA 编码的一个重要蛋白,是能量储存、运输和供应的主要载体,它在植物体生长发育过程中起着重大作用。花的形成是植物生殖生长阶段最为显著的特征(韩瑶瑶等, 2015)。花粉细胞是植物雄性器官中的重要细胞,在植物授精、遗传物质的传递等生殖过程中具有重要作用(张姣等, 2015)。在花粉发育过程中,若未得到充足的能量供应,势必会影响花粉的正常活动从而影响其育性。研究表明,ATP 合酶与植物雄性不育性之间存在很大关系,姚雅琴等研究认为 K 型小麦细胞质雄性不育系与保持系之间存在的 ATP 酶活性差异可能是导致小麦花粉败育的重要因素(姚雅琴等, 2002)。侯建华等采用比较生理学的方法对甜菜细胞质雄性不育系及其保持系生殖生长阶段的 ATP 酶活性进行了研究,结果表明不育系低于其保持系(侯建华等, 2003)。另外有但是在不育株系中的 *orfB* 基因具有一个更长的转录本;5'RACE 分析表明,长的 *orfB* 转录本比保持系的多 370bp,将其与基因组 DNA 序列比较显示长的转录本并非嵌合基因,这表明 *orfB* 基因很可能与水稻的雄性不育性有关。对芥菜线粒体基因的研究表明, *orfB* 基因很可能与芥菜 CMS 性有关(Yang et al., 2009)。烟草由于易于进行分子生物学等方面的操作,已成为植物分子领域常用的模式植物(余世洲等, 2015; 吕玉伟等, 2016),我们此前报道过其 ATP 合酶 F<sub>0</sub> 部分的 *atp6*(赵婷等, 2009; 周玮等, 2012)、*atp9*(周玮等, 2007)、*orf25*(刘齐元等, 2009)基因与雄性不育性有关联,但目前还未曾见过有关 *orfB* 基因与烟草 CMS 之间关系的报道。

本研究对 3 对烟草雄性不育系及其相应保持系中的 *orfB* 基因进行 PCR 扩增和测序分析,研究不育系及其保持系之间线粒体 ATP 合酶 F<sub>0</sub> 部分的 *orfB* 基因在 DNA 序列上的差异。该研究旨在探究 *orfB* 基因与烟草雄性不育之间的关系,以期进一步

很多报道也都认为雄性不育的产生是由于花药中的能量供求平衡受到破坏而导致的(伊风艳等, 2014; Sabar et al., 2000; 吕俊恒和邓明华, 2014)。

位于植物线粒体内膜上的 ATP 合成酶对花粉物质代谢、能量转化及其生长发育等生命活动起着重要作用(周伯等, 2015)。研究表明,编码 ATP 合酶的单个基因或者多个基因产物可能会因影响线粒体 ATP 合酶的功能,从而干扰高耗能的花粉发育过程而导致植物雄性不育的发生(Dieterich et al., 2003; Bergman et al., 2000)。ATP 合酶由 F<sub>0</sub> 和 F<sub>1</sub> 两部分组成, F<sub>0</sub> 部分包括 *atp6*、*atp9*、*orf25* 和 *orfB* 4 个亚基基因,大量研究表明,在许多植物中这 4 个基因都与雄性不育性之间存在明显的关系(Nakajima et al., 2001; Sabar et al., 2003; Heazlewood et al., 2003; Kim and Kim, 2006; 段继强等, 2008; 韩艳芬等, 2010; 张智等, 2012)。Nakajima 等(2001)研究表明,胡萝卜线粒体内的 *orfB* 基因的结构与花瓣的表现型以及花的 CMS 性之间存在一定的相关性,并且它的表达是由转录后水平来调节的。Das 等(2010)就籼稻不育系及其同型保持系的 *atp6* 和 *orfB* 这两个线粒体基因进行了 RELP 检测,结果表明两系的 *atp6* 基因在 RNA 结构上无差异,探讨 ATP 合酶 F<sub>0</sub> 部分 4 个亚基联合作用与烟草雄性不育性的关系,为进一步研究烟草 CMS 分子机理提供基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 烟草花蕾总 DNA 质量的检测

取 3μl 总 DNA 提取液电泳检测其完整性。结果表明,所提取的总 DNA 质量较好,条带完整,无降解。采用紫外分光光度法测定结果表明,所有样品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 均为 1.8~1.95,表明其中无蛋白质污染且浓度均达到 100ng/μL 左右(图 1)。综上可知所提取基因组 DNA 质量能够满足进一步试验的要求。

### 1.2 *orfB* 基因的特异引物 PCR 扩增

目的基因 *orfB* 的特异引物 PCR 扩增产物经电泳检测(图 2)表明,扩增产物在 3 种供试材料间不存在差异,且在大概 600bp 处均有一条明亮清晰的扩增条带,与预期片段大小(604bp)相吻合,说明该引物

的扩增产物即为 *orfB* 基因的 DNA 片段。

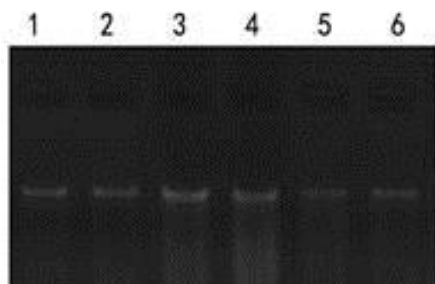


图 1 烟草花蕾总 DNA 电泳检测

注: 1; MSzy90; 2: zy90; 3: MSyy85; 4: yy85; 5: MSK326; 6: K326

Figure 1 The agarose gel electrophoretogram of flower bud total DNA in tobacco

Note: 1; MSzy90; 2: zy90; 3: MSyy85; 4: yy85; 5: MSK326; 6: K326

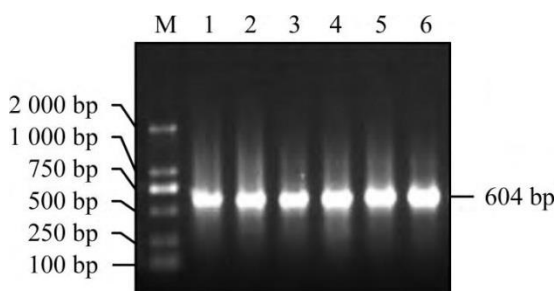


图 2 烟草线粒体 *orfB* 基因的 PCR 扩增

注: M: DL2000 Marker; 1: MSzy90; 2: zy90; 3: MSyy85; 4: yy85; 5: MSK326; 6: K326

Figure 2 PCR amplification of *orfB* gene in tobacco mitochondrion

Note: DL2000 Marker; 1: MSzy90; 2: zy90; 3: MSyy85; 4: yy85; 5: MSK326; 6: K326

### 1.3 *orfB* 基因的测序结果与序列分析

测序结果表明, 18 个样品中, 特异片段的核苷酸序列长度均为 604bp。目的基因 *orfB* 自身 DNA 序列长度为 471bp, 且每个测序样品中均包含了该基因的全部序列。

BLASTn 分析表明(图 3), 9 个保持系材料的 *orfB* 基因序列没有差异, 且与 GenBank 中所收录的该基因序列完全一致, 相似性均为 100%。这进一步说明了 PCR 产物即为本实验研究的目的基因, 也说明了各供试材料测序结果的准确性。9 个不育系材料的 *orfB* 基因序列也完全相同, 但与 GenBank

中所收录的该基因序列略有差别, 相似性均为 99.79%。这一结果说明从不育系材料中所扩增出来的产物是目的基因 *orfB*, 但其在不育系与保持系之间存在碱基差异位点。

序列比对后发现, 保持系与 GenBank 中的 *orfB* 基因序列相同; 不育系较保持系和 GenBank 中的 *orfB* 基因序列, 在第 363 位点存在 1 个由 A→C 的碱基突变, 且在 9 个不育系材料中的碱基突变位点完全相同(图 3)。

在中烟 90 与 MS 中烟 90 的部分测序峰里, 9 个不育系材料中, *orfB* 基因的测序峰图都存在同样位点的碱基突变(图 4)。另外, 将不育系与保持系 *orfB* 基因序列翻译成相对应的氨基酸序列, 结果发现不育系中第 363 位点的碱基改变导致了该位点所编码氨基酸的变化, 即由保持系中的亮氨酸(Leu)变成了不育系中的苯丙氨酸(Phe)。推测这种结构的变化是引起烟草雄性不育的重要原因之一。

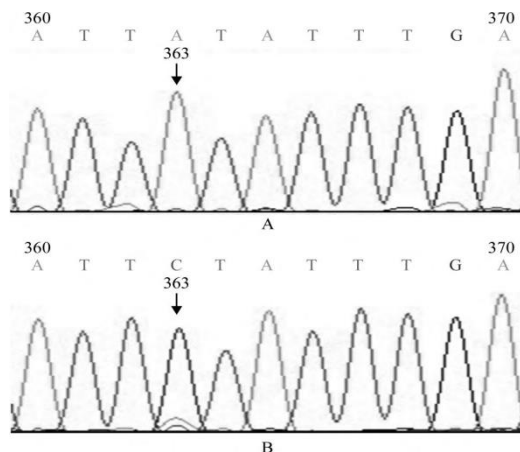


图 4 MS 中烟 90 *orfB* 基因碱基突变位点

Figure 4 The mutation site of *orfB* gene in the MS Zhongyan90

本研究通过对 3 对烟草胞质雄性不育系及其同型保持系线粒体 ATP 合酶 F<sub>0</sub> 部分的 *orfB* 基因序列进行扩增和测序后证明了与同型保持系相比, 所测序的 9 个不育系样品中的 *orfB* 基因序列都存在 363 位点的碱基突变, 且均导致了所编码氨基酸种类的变化。在实验过程中对每个样品重复进行了 3 次测序, 且每个目的基因的测序结果在所有测序的不育系材料中都保持一致。另外在后续实验(另文发表)中用相同的材料对该基因的 cDNA 进行测序, cDNA 中也存在与 DNA 一致的碱基突变位点, 这进一步证实了实验结果的准确性。

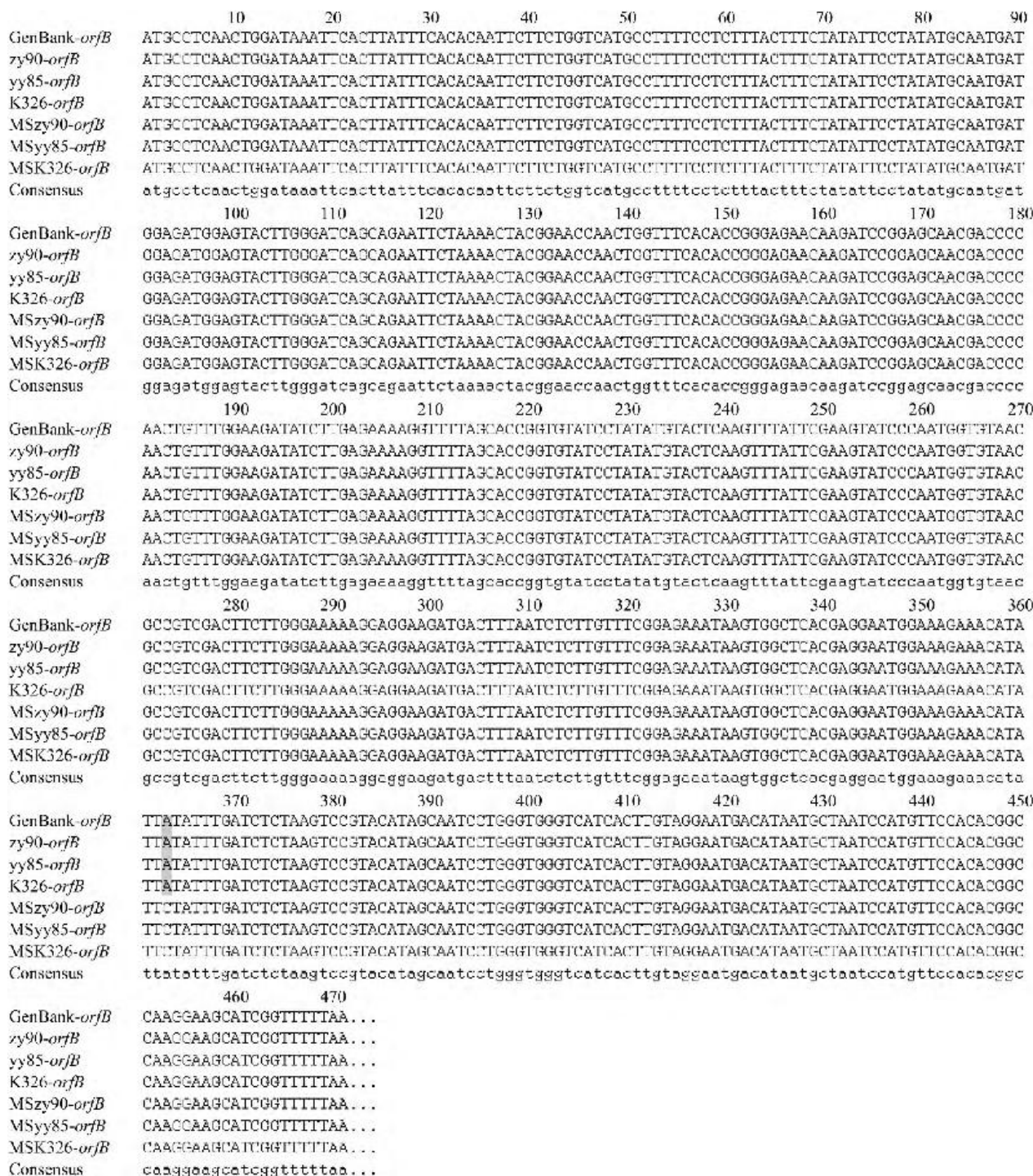


图3 烟草不育系、保持系以及 GenBank 中 *orfB* 基因序列差异比较

Figure 3 Comparison of *orfB* gene sequences among cytoplasmic male sterility, maintainer lines and GenBank in tobacco

从实验结果及之前的相关报道来看，可以证实烟草细胞质雄性不育系中线粒体 ATP 合酶 F<sub>0</sub> 部分的 4 个亚基基因 *atp9*、*atp6*、*orf25*、*orfB* 确实存在不同位点的碱基突变，且大多数位点的突变都导致了该位点所编码的氨基酸变化。烟草雄性不育系中

这 4 个基因中的一个或者几个或者全部的基因突变位点很有可能就是导致烟草细胞质雄性不育产生的重要突变位点，但是至于这些基因发生的碱基突变是如何影响 ATP 合酶的结构和功能，进而使机体的能量代谢受到影响，最终导致烟草细胞质雄性不

育性的形成，还有待于更进一步的深入研究。下一步将对 ATP 合酶  $F_0$  部分的 4 个亚基基因的转录本进行测序，研究其编辑效应，分析转录水平上多基因与烟草雄性不育性之间的关系；进而利用生物信息学方法比较 4 个亚基基因推导蛋白在不育系和保持系中各结构层次(一级、二级、超二级和三级结构)上的差异，构建蛋白质互作模型，预测  $F_0$  亚基互作特征，构建  $F_0$  亚基互作网络，分析蛋白质水平上 4 个亚基基因的联合效应与烟草雄性不育性之间的调控机理。

### 3 材料与amp;方法

#### 3.1 实验材料

供试材料为 3 对新质源烟草细胞质雄性不育系及其同型保持系，分别为：(1)MS 中烟 90(MSzy90)和中烟 90(zy90)；(2)MS 云烟 85(MSy85)和云烟 85(yy85)；(3)MSK326 和 K326。试验在江西农业大学农学院作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室，于 2015 年 3 月~2015 年 9 月份进行。

#### 3.2 DNA 提取

取适量上述供试材料的花蕾，采用 CTAB 改进法(朱腾义等, 2010)提取烟草花蕾总 DNA，所提 DNA 经纯化后进行检测。取 3  $\mu$ L DNA，加入溴酚蓝，在 1%的琼脂糖凝胶上电泳，检测 DNA 浓度、分子大小及片段完整性。

#### 3.3 引物合成与 PCR 扩增

根据 NCBI 中 GenBank 数据库收录的烟草线粒体完全基因组序列(登录号: BA000042)，利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对扩增 *orfB* 基因的特异性引物：上游引物 B1F 为：5'-ACTACTCGTACAGGCTTGAC-3'，下游引物 B2R 为：5'-TATCACCTTACCTTCCGTCA-3' (扩增片段长度 604bp)，引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

以 3 个烟草雄性不育系及其保持系花蕾基因组 DNA 为模板，用所设计的引物对 *orfB* 基因进行 PCR 扩增，PCR 扩增体系(25 $\mu$ L)如下：12.5  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR Master Mix、1  $\mu$ L (5  $\mu$ mol/L) 上、下游引物、1  $\mu$ L DNA 模板和 9.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。扩增程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3min、94 $^{\circ}$ C 变性 40s、60 $^{\circ}$ C 退火 30s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1min、进行

36 个循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。反应结束后 4 $^{\circ}$ C 保存。

#### 3.4 *orfB* 基因的电泳检测与序列分析

取 3 $\mu$ L PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，采用 DNA 凝胶回收试剂盒将 3 种不育材料及其保持系的特异片段回收并测序，每个样品重复 3 次，序列测定工作委托生工生物工程(上海)有限公司完成。

利用 DNAMAN 软件将从烟草雄性不育系及其同型保持系扩增的 *orfB* 基因与 GenBank 数据库所收录的烟草 *orfB* 基因序列进行比对，并分析其编码的氨基酸序列。

#### 作者贡献

陶瑶和王瑜是本研究实验工作的具体执行人，完成数据分析和论文初稿的撰写；吴凌敏、谢丽娟和聂亚平负责文献查阅、实验辅助；周玮、钟思荣和王建革负责部分实验操作以及图表的绘制；刘齐元是项目的构思者及负责人，指导实验设计，论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

#### 致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31260350; 31301388)和江西省教育厅科技计划项目(GJJ13275)共同资助。

#### 参考文献

- Ba Q.S., Zhang G.S., Li G.P., and Fu Z.L., 2015, Research advances on the relationship between mitochondrion and cytoplasmic male sterility in wheat, *Mailei Zuowu Xuebao* (Journal of Triticeae Crops), 35(1):16-21(巴青松, 张改生, 李桂萍, 傅兆麟, 2015, 小麦线粒体与细胞质雄性不育关系的研究进展, 麦类作物学报, 35(1):16-21)
- Bergman P., Edqvist J., Farbos I., and Glimelius K., 2000, Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial *atp1* transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio, *Plant Molecular Biology*, 42(3):531-544
- Das S., Sen S., Chakraborty A., Chakraborty P., Maiti M., Basu A., Basu D., and Sen S., 2010, An unedited 1.1 kb mitochondrial *orfB* gene transcript in the Wild Abortive Cytoplasmic Male Sterility (WA-CMS) system of *Oryza sativa* L. subsp. Indica, *Bmc Plant Biology*, 10(1):76-78
- Dieterich J.H., Braun H.P., and Schmitz U.K., 2003, Alloplasmic male sterility in *Brassica napus* (CMS 'Tournfortii-Stiewe') is associated with a special gene

- arrangement around a novel *atp9* gene, *Molecular Genetics and Genomics*, 269(6): 723-731
- Duan J.Q., Du G.H., Li J.Y., Liang X.N., and Liu F.H., 2008, Cloning and expression of *atp6* and *atp9* genes from ramie (*boehmeria nivea*(L.)Gaud.) and their relationship with cytoplasmic male sterility, *Yichuan (Hereditas)*, 30(11): 1487-1498(段继强, 杜光辉, 李建永, 梁雪妮, 刘飞虎, 2008, 苧麻 *atp6* 和 *atp9* 基因的克隆表达及与细胞质雄性不育的相关性, *遗传*, 30(11): 1487-1498)
- Han Y.F., Zhang L.Y., Hu J.M., Zhang G.S., Li Y.X., Sheng Y., Wei F., Niu N., and Ma S.C., 2010, Editing sites in transcript of mitochondrial *atp6* gene of male sterile line with *Aegilops Kotschy* cytoplasm in wheat, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 36(12): 2179-2184 (韩艳芬, 张龙雨, 胡俊敏, 张改生, 李亚鑫, 盛英, 位芳, 牛娜, 马守才, 2010, 黏类小麦细胞质雄性不育线粒体 *atp6* 基因转录本编辑位点, *作物学报*, 36(12): 2179-2184)
- Han Y.Y., Ma Y.Q., Li D.Z., and Xu Z.Q., 2015, The Influences of Arabidopsis *Pri-miR156a* on flowering time of *Nicotiana tabacum*, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(2): 350-356(韩瑶瑶, 马燕勤, 李典珍, 徐子勤, 2015, 拟南芥 *Pri-miR156a* 基因对烟草开花时间的影响, *基因组学与应用生物学*, 34(2): 350-356)
- Heazlewood J.L., Whelan J., and Millar A.H., 2003, The products of the mitochondrial *orf25* and *orfB* genes are F<sub>0</sub> components in the plant F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, *FEBS Letters*, 540(1): 201-205
- Hou J.H., Tian Z.H., He X.Q., Zhang H.Z., and Shang J.W., 2003, Difference of some physiological property of cytoplasmic male sterile line and maintainer line in sugarbeet, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculture Borioli-simica)*, 18(3): 32-35 (侯建华, 田自华, 贺学勤, 张惠忠, 邵金旺, 2003, 甜菜胞质雄性不育系与保持系某些生理特性的差异, *华北农学报*, 18(3): 32-35)
- Kim D.H., and Kim B.D., 2006, The organization of mitochondrial *atp6* gene region in male fertile and CMS lines of pepper (*Capsicum annuum* L.), *Current genetics*, 49(1): 59-67
- Liu Q.Y., Zhu T.Y., Zhao T., and Huang H.Q., 2009, Aberrant mitochondrial gene *ORF25* may cause tobacco male sterility, *Jiangxi Nongye Daxue Xuebao (Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis)*, 31(1): 54-57(刘齐元, 朱滕义, 赵婷, 黄海泉, 2009, 异常线粒体基因 *ORF25* 可能导致烟草雄性不育, *江西农业大学学报*, 31(1): 54-57)
- Lv J.H., and Deng M.H., 2014, Relationship between male sterility and energy metabolism in plants, *LajiaoZazhi(Journal of China Capsicum)*, 12(1):1-6 (吕俊恒, 邓明华, 2014, 植物雄性不育与能量代谢的关系, *辣椒杂志*, 12(1):1-6)
- Lv Y.W., Zhang Y.J., Lv Y.W., Wang R J., Yang Z.S., and Wang Y.J., 2016, Transformation of *Mytilus galloprovincialis* foot protein type 5 (*Mgfp-5*) gene in tobacco, *Jiyinzuxue Yu Fenzi Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(1): 172-182(吕玉伟, 张雨婧, 吕亚维, 王睿劼, 杨泽熿, 王英娟, 2016, 贻贝粘蛋白 *Mgfp-5* 基因在烟草中的转化, *基因组学与应用生物学*, 35(1): 172-182)
- Mohr S., Schulte-Kappert E., Odenbach W., Oettler G., and Kuck U., 1993, Mitochondrial DNA of cytoplasmic male-sterile *Triticum timopheevi*: rearrangement of upstream sequences of the *atp6* and *orf25* genes, *Theoretical and Applied Genetics*, 86(2): 259-268
- Mouras A., Suharsono., Hernould M., Zabaleta A., and Araya A., 1999, Inheritance of an induced male-sterile trait in transgenic plants expressing an engineered unedited *atp9* mitochondrial gene, *Theor Appl Genet*, 98(3-4): 614-621
- Nakajima Y., Yamamoto T., Muranaka T., and Oeda K., 2001, A novel *orfB*-related gene of carrot mitochondrial genomes that is associated with homeotic cytoplasmic male sterility (CMS), *Plant molecular biology*, 46(1): 99-107
- Sabar M., Gagliardi D., Balk J., and Leaver C.J., 2003, *ORFB* is a subunit of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower, *EMBO reports*, 4(4): 381-386
- Sabar M., Paeppe R.D., and Kouchkovsky Y., 2000, Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*, *Plant Physiology*, 124(3): 1239-1250
- Shi Z., Cheng D.Y., Luo C.F., Liu Q.H., Shi S.Z., Cui J, 2012, The study of RNA editing sites of the *atp6* gene transcripts in sugar-beet mitochondria, *Fenzi Zhiwu Yuzhong(Molecular Plant Breeding)*, 10(4): 428-432(施真, 程大友, 罗成飞, 刘巧红, 史淑芝, 崔杰, 2012, 甜菜线粒体 *atp6* 基因转录本的 RNA 编辑位点研究, *分子植物*



- 育种, 10(4): 428-432)
- Yang J.H., Zhang M.F., and Yu J.Q., 2009, Mitochondrial *nad2* gene is co-transcribed with CMS-associated *orfB* gene in cytoplasmic male-sterile stem mustard (*Brassica juncea*), *Molecular Biology Reports*, 36(2): 345-351
- Yao Y.Q., Zhang G.S., Liu H.W., and Wang J.W., 2002, Studies on correlation between intine and K-Type cytoplasmic male sterility in wheat, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreal-Occidentalia Sinica)*, 22(2): 333-337(姚雅琴, 张改生, 刘宏伟, 王军卫, 2002, K型小麦花粉粒内壁及 ATP 酶活性与雄性不育的相关性, *西北植物学报*, 22(2): 333-337)
- Yi F.Y., Shi F.L., Gao C.P., Xiong M., Ye R.H., and Cai L.Y., 2014, A comparative analysis of physiological and biochemical characteristic between alfalfa male sterile plants and male fertile plants, *Zhongguo Caodi Xuebao (Chinese Journal of Grassland)*, 6(6): 60-65(伊凤艳, 石凤翎, 高翠萍, 熊梅, 晔蕾罕, 蔡丽艳, 2014, 苜蓿雄性不育株与可育株生理生化特性的比较, *中国草地学报*, 36(6): 60-65)
- Yu S.Z., Zhang L., Zhang J., and Zhao J.H., 2015, The research progress of genomics in *Nicotiana* Species, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue(Genomics and Applied Biology)*, 34(7):1541-1548(余世洲, 张磊, 张洁, 赵杰宏, 2015, 烟属物种基因组研究进展, *基因组学与应用生物学*, 34(7):1541-1548)
- Zhang J., Zhu Q.D., Ju L., Zhang G.S., Yu Y.A., Niu N., Wang J.W., and Ma S.C., 2015, Organization changes of actin cytoskeleton and callose with the expression analysis of related genes in physiological male sterile wheat, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 48(14):2687-2696(张皎, 朱启迪, 巨岚, 张改生, 于永昂, 牛娜, 王军卫, 马守才, 2015, 小麦生理型雄性不育系微丝骨架和胼胝质的变化与其相关基因的表达分析, *中国农业科学*, 48(14):2687-2696)
- Zhang Z., Liang Y., Ding H.F., and Zhang H.W., 2012, Study on cloning and expression of *atp9* gene in carrot and its relationship to cytoplasmic male sterility, *Beifang Yuanyi(Northern Horticulture)*, (24): 140-144(张智, 梁毅, 丁海凤, 张洪伟, 2012, 胡萝卜 *atp9* 基因的克隆表达及细胞质雄性不育的相关性研究, *北方园艺*, (24): 140-144)
- Zhou B., Sha W., Zhang M.J., Zhang C.L., and Suo L., 2015, Cloning and expression analysis of ATP synthase II subunit gene *RcatpG* in *Racomitrium canescens*, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue(Genomics and Applied Biology)*, 34(7):1435-1442(周伯, 沙伟, 张梅娟, 张春蕾, 索荔, 2015, 砂藓 ATP 合酶 II 亚基基因的克隆及表达分析, *基因组学与应用生物学*, 34(7):1435-1442)
- Zhou W., Liu Q.Y., Chen X.F., Liu F.H., Cao H., and Liu C.Q., 2007, Studies on *atp9* mRNA related to cytoplasmic male sterility in tobacco, *Guangxi Zhiwu (Guihaia)*, 27(1): 114-120(周玮, 刘齐元, 陈雪峰, 刘飞虎, 曹槐, 刘次全, 2007, 与烟草细胞质雄性不育相关的线粒体基因 *atp9* 的 mRNA 研究, *广西植物*, 27(1): 114-120)
- Zhou W., Liu Q.Y., Zhu T.Y., Fang D.D., Zhu X.W., and Cheng Y.Q., 2012, Bioinformatics analysis of *atp6* gene related to tobacco male sterility, *Henong Xuebao (Journal of Nuclear Agricultural Sciences)*, 26(1): 0054-0059 (周玮, 刘齐元, 朱腾义, 范东东, 朱肖文, 程元强, 2012, 雄性不育烟草 *atp6* 基因育性相关生物信息学分析, *核农学报*, 26(1): 0054-0059)
- Zhu T.Y., Fan D.D., Zhao T., Liu Q.Y., Wang J.G., Zhu X.W., and Cheng Y.Q., 2010, SNP detection in tobacco (*Nicotiana tabacum*) mitochondrial gene *cox II* and its association with CMS, *Henong Xuebao (Journal of Nuclear Agricultural Sciences)*, 24(4): 720-727(朱腾义, 范东东, 赵婷, 刘齐元, 王建革, 朱肖文, 程元强, 2010, 烟草线粒体基因 *cox II* 的 SNP 检测及其与 CMS 的相关性分析, *核农学报*, 24(4): 720-727)
- Zhao T., Zhu T.Y., Liu Q.Y., Zhang M.L., and Jiang H.Y., 2009, SNP in tobacco mitochondrial gene *atp6* and its correlation with CMS, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 35(9):1655-1661(赵婷, 朱腾义, 刘齐元, 张美良, 蒋海燕, 2009, 烟草线粒体基因 *atp6* 的 SNP 及其与 CMS 的相关性, *作物学报*, 35(9):1655-1661)