

RAV基因对拟南芥和大豆不定芽再生的影响

卢清瑶, 赵琳, 李冬梅, 谷月娇, 张彦威, 吕庆雪, 刘丽雪, 李文滨

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室, 东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: RAV基因是具有AP2/ERF结构域的转录因子家族成员之一, 以拟南芥 *rav* 突变体和 *GmRAV* 干涉 (*GmRAV-i*) 大豆的不同外植体为材料进行愈伤组织诱导, 分别在芽诱导培养基中加入不同浓度的外源细胞分裂素 2-ip 和 6-BA, 考察平均不定芽数和不定芽再生频率。结果表明: 与野生型材料相比, 拟南芥 *rav* 突变体和 *GmRAV-i* 大豆在适宜的 2-ip 和 6-BA 浓度下平均不定芽数和不定芽再生频率均有所降低。证明 RAV 基因同系物在不同植物间具有功能保守性, 并且在细胞分裂素存在下促进植物不定芽的再生。

关键词: 大豆; *GmRAV*; 拟南芥; 不定芽再生; 细胞分裂素

中图分类号: Q945.48, S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)01-0023-05

Effects of RAV gene on Shoot Regeneration of *Arabidopsis* and Soybean

LU Qing-yao, ZHAO Lin, LI Dong-mei, GU Yue-jiao, ZHANG Yan-wei, LV Qing-xue, LIU Li-xue, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: RAV is a member of the ERF/AP2 transcription factor family. We use explants of *Arabidopsis rav* T-DNA insertion homozygous mutants and inhibition (-i) of *GmRAV* in soybean as experimental material to carry out callus induction. Various concentration of exogenous Cytokinins 2-ip and 6-BA were added in the shoot-inducing medium and the changes in the average number of shoots and the shoot regeneration rates were investigated. It turned out that Cytokinins had positive effects on the shoot regeneration, in addition, the average number of shoots and shoot regeneration rates of *Arabidopsis rav* mutants and *GmRAV-i* soybean plants would decrease by 2-ip and 6-BA. It proved that the function of RAV homologs was conserved and RAV promoted shoot regeneration in the presence of Cytokinins.

Key words: Soybean; *GmRAV*; Shoot regeneration; Cytokinins

大豆 (*Glycine max* L. Merrill) 是重要的粮食、饲料和油料作物, 在农业生产中占有相当重要的地位。长期以来, 相对于水稻、玉米、烟草等作物, 大豆是公认的难转化的作物。国内外相继报道了以大豆不同器官为外植体, 通过器官发生或胚胎发生以及从原生质体培养成功获得再生植株, 但大豆转化的频率仍然很低。因此, 鉴定新的大豆芽再生相关基因, 提高大豆的遗传转化效率变得尤为重要。程林梅等^[1] 对大豆不同外植体再生体系进行了研究, 并获得较高频率的再生植株。但不同基因型、激素浓度对植株再生的影响有较大的差异。RAV 转录因子在拟南芥中被首先克隆出来, 它含有 AP2/ERF 与 B3 两种 DNA 结合结构域。而 ERF 的 4 个亚家族转录因子基因 (ESR1, ESR2, RAP2.6L 和 BBM) 都会增加愈伤组织再生不定芽的能力^[2-5]。在拟南芥中, 细胞分裂素的合成及其信号传导能够影响芽再生速率^[6-9]。为此, 本试验利用 T-DNA 插

入的拟南芥 *rav* 突变体根^[6,10] 和 *GmRAV-i* 大豆子叶节外植体为试验材料, 分别在基础培养基中附加不同浓度的 2-ip (N6-异戊烯腺嘌呤) 和 6-BA (6-苄基腺嘌呤), 研究了 RAV 基因对拟南芥和大豆不定芽再生的影响, 为提高大豆的遗传转化效率奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥 *rav* 突变体 (SALK_029626c) T₂ 代种子, 由美国俄亥俄州立大学拟南芥生物资源 (*Arabidopsis* Biological Resource Center, ABRC) 提供。Columbia 型拟南芥, 东农 50 和 *GmRAV-i* T₆ 代转基因大豆由东北农业大学大豆研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 种子的消毒与萌发 拟南芥种子 4℃ 春化 3 d 后, 用 10% NaClO 涡旋振荡 8 ~ 10 min 充分消

收稿日期: 2012-10-10

基金项目: 国家自然科学基金 (31101169, 30671318, 31271748); 转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08004-005); 黑龙江省教育厅大豆分子设计团队项目; 黑龙江省教育厅省高校青年学术骨干项目; 东北农业大学博士基金。

第一作者简介: 卢清瑶 (1988-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: lu.qing.yao@163.com。

通讯作者: 李文滨 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

毒,再用无菌水冲洗3~4次,种在含2%的MS蔗糖培养基上,每个平皿播约100粒种子,并在22℃和16 h光照/8 h黑暗的光周期下垂直培养发芽。

取表面光滑无病斑的大豆成熟种子,放入NaClO:HCl=24:1,HCl稍过量的滤器中灭菌后,超净工作台吹30 min,接种至B₅培养基中,在25℃和16 h光照/8 h黑暗的光周期下萌发。

1.2.2 拟南芥 T-DNA 插入突变体的鉴定 利用“双引物法”进行鉴定。以拟南芥 *rav* 突变体基因组DNA为模板,首先用一对特异引物 LP(5'-AATCTCATGTGAACCCCTTC3')和 RP(5'-CGCTGATGCTTCTCGTAAATC3')进行PCR扩增目的基因片段,再用T-DNA片段的特异引物 LB(5'-ATTTTGC-CGATTTTCGGAAC3')和 RP作为一对引物,PCR扩增目的基因T-DNA插入片段,以确证所获突变体为T-DNA插入目的基因的突变体。两组引物PCR均有条带的植株为杂合突变体,后者PCR有条带的植株即为纯合突变体。PCR反应循环参数:94℃ 1 min,53℃ 1 min,72℃ 1 min,35次循环。8%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.2.3 愈伤组织的培养 愈伤组织培养基为B₅基本培养基中附加2.2 μmol·L⁻¹2,4-D,0.2 μmol·L⁻¹激动素KT,2%蔗糖,0.59 g·L⁻¹ MES,0.8%琼脂,pH5.5。将苗龄8 d的拟南芥 *rav* 突变体植株的根系切成大约5 mm的切段,接种于愈伤组织培养基中。每个平皿接入约30个外植体,每个处理3次重复。在温度22℃和16 h光照/8 h黑暗条件下进行培养。

1.2.4 不定芽的培养 拟南芥生芽培养:3 d后将根愈伤组织转至芽诱导培养基上,进行生芽培养,观察其分化情况。芽诱导培养基以B₅为基本培养基,添加6种不同浓度的2-ip(0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μmol·L⁻¹),2%蔗糖,0.75 μmol·L⁻¹ IAA,0.59 g·L⁻¹ MES,8%琼脂,pH5.6。每个处理3次重复,每次重复接种30块愈伤组织。

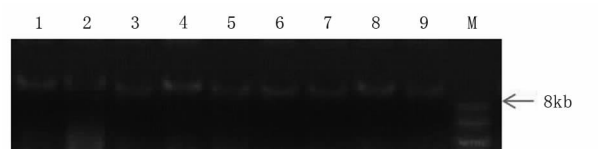
大豆生芽培养:切萌发7 d后的大豆子叶节,将其直接转至芽诱导培养基上,进行生芽培养,观察其分化情况。芽诱导培养基以B₅为基本培养基,添加不同浓度的6-BA(0、0.1、0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹),3%蔗糖,0.59 g·L⁻¹ MES,8%琼脂,pH5.6。每个处理3次重复,每次重复接种20块愈伤组织。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 *rav* 突变体植株鉴定

提取拟南芥 *rav* 突变体的基因组DNA(图1),

将其作为模板,以LP和RP为引物PCR扩增(图2),泳道1~8初步认为是*AtRAV*基因的纯合突变体,再以1~8号DNA为模板,LB和RP为引物进行PCR扩增(图3),鉴定得到T-DNA插入纯合突变体植株,其扩增得到的条带与目的基因特异性扩增条带位置一致,证明所用的拟南芥 *rav* 突变体材料为拟南芥 *RAV* 基因T-DNA插入纯合突变体。



M:Trans2K™ Plus II DNA 标准分子量;1~9:基因组DNA

M:Trans2K™ Plus II DNA Maker;1-9:Genomic DNA

图1 拟南芥植株基因组DNA的提取

Fig. 1 Extracting of *Arabidopsis* genomic DNA

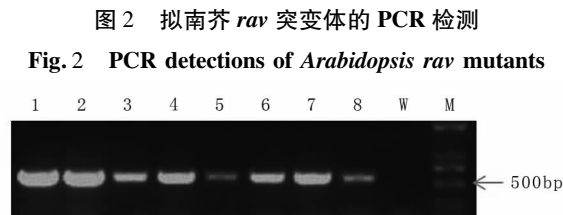


M:Trans2K™ Plus II DNA 分子量标记;W:Columbia型拟南芥植株;1~8:拟南芥突变体植株

M:Trans2K™ Plus II DNA Marker;W:Arabidopsis Columbia type;1-8:Arabidopsis mutants

图2 拟南芥 *rav* 突变体的PCR检测

Fig. 2 PCR detections of *Arabidopsis rav* mutants



M:Trans2K™ Plus II DNA 分子量标记;W:Columbia型拟南芥植株;1~8:拟南芥突变体植株

M:Trans2K™ Plus II DNA Marker;W:Arabidopsis Columbia type;1-8:Arabidopsis mutants

图3 拟南芥 *rav* 突变体为纯合T-DNA插入的PCR检测

Fig. 3 PCR detections of *Arabidopsis rav* mutants

as T-DNA insertion homozygously

2.2 2-ip 对拟南芥 *rav* 突变体不定芽再生的影响

先以Columbia型拟南芥为材料,找到适宜的2-ip浓度进行拟南芥 *rav* 突变体的不定芽再生试验。芽诱导培养基上培养22 d后,观察不定芽再生的状态及不定芽数。从图4可见,当2-ip浓度为0.1 μmol·L⁻¹时,开始有不定芽出现;当2-ip浓度小于5.0 μmol·L⁻¹时,Columbia型拟南芥的不定芽数随着2-ip浓度的增加而急剧增加,颜色逐渐加绿;当2-ip浓度大于5.0 μmol·L⁻¹时,Columbia型拟南芥的不定芽数则随2-ip浓度增加呈下降趋势,

颜色由绿色转为黄白色,长势欠佳。其中当 2-ip 浓度为 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽数最多且长势最好。

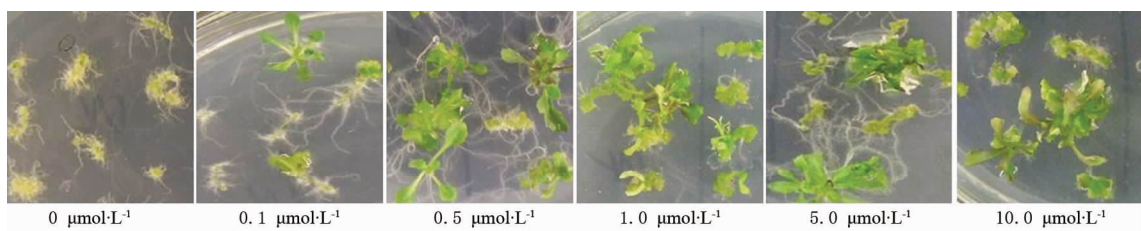


图 4 不同浓度的 2-ip 对 *Columbia* 型拟南芥不定芽生长的影响

Fig. 4 Effect of various 2-ip concentrations on shoot growth of *Columbia Arabidopsis*

选取 0、0.5、1.0 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-ip 进行拟南芥 *rav* 突变体的根外植体不定芽再生试验并统计其再生频率。如图 5 和表 1 所示,2-ip 浓度为 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 *Columbia* 型拟南芥有不定芽出现,平均不定芽数为 9,不定芽再生频率为 22.5%,拟南芥 *rav* 突变体没有不定芽出现;当 2-ip 浓度为 1.0 和 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 *Columbia* 型拟南芥的平均不定芽数

和不定芽再生频率均高于拟南芥 *rav* 突变体。其中在 2-ip 浓度为 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 *Columbia* 型拟南芥的平均不定芽数比拟南芥 *rav* 突变体不定芽数多一倍,不定芽再生频率比拟南芥 *rav* 突变体再生频率高 40%。而且 *Columbia* 型拟南芥的不定芽绿且大。结果表明,拟南芥 *rav* 突变体在 2-ip 的存在条件下不定芽的再生能力明显降低。

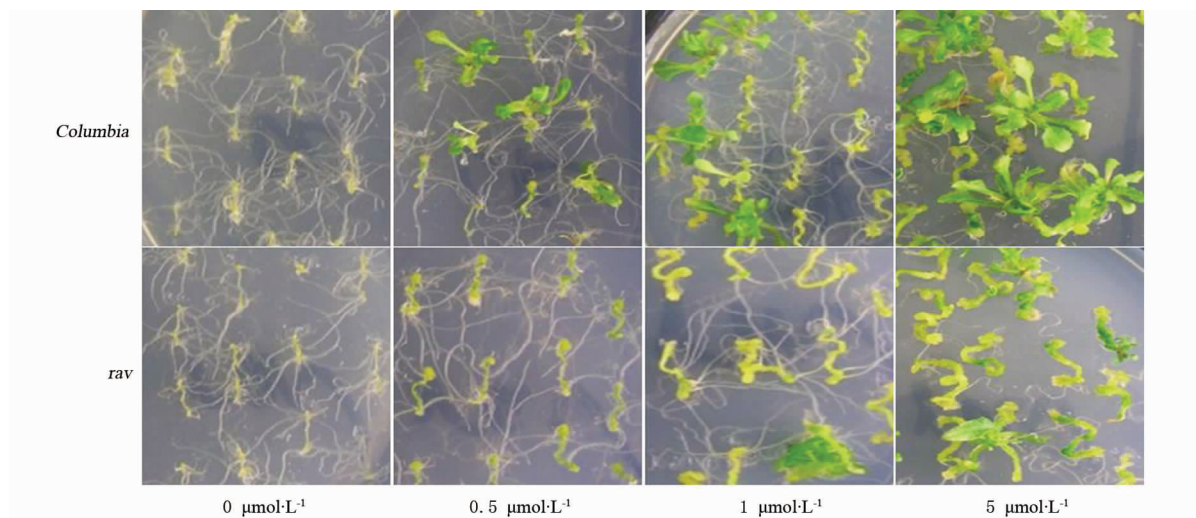


图 5 不同浓度的 2-ip 对拟南芥 *rav* 突变体不定芽再生频率的影响

Fig. 5 Effect of various 2-ip concentrations on shoot regeneration rate of *Arabidopsis rav* mutants

表 1 不同浓度的 2-ip 对拟南芥 *rav* 突变体的根的外植体不定芽再生的影响

Table 1 Effects of various concentrations of 2-ip on shoot regeneration from root explants of *Arabidopsis rav* mutants

2-ip 浓度 2-ip concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	平均不定芽数 Shoot number		不定芽再生频率 Shoot regeneration rate/%	
	<i>Columbia</i>	<i>rav</i>	<i>Columbia</i>	<i>rav</i>
0	0	0	0	0
0.5	9	0	22.50	0
1.0	11	7	27.50	17.50
5.0	31	15	77.50	37.50

2.3 6-BA 对 *GmRAV-i* 大豆不定芽再生的影响

先以东农 50 为材料,摸索适宜的 6-BA 浓度进行 *GmRAV-i* 大豆的芽再生实验,芽诱导培养基上培养 9 d 后,观察不定芽再生的状态及不定芽数。从图 6 可知,在 6-BA 浓度为 0.167 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已经有不定芽出现,外植体不定芽多且绿;但随着 6-BA 浓度的增加,不定芽伴随着黄化,长势不好。

选择 0.083 5 和 0.167 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 处理 *GmRAV-i* 大豆,进行不定芽再生试验。从图 7 和表 2 中可以观察到,在 6-BA 浓度为 0.0835 和 0.167 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 *GmRAV-i* 大豆的平均不定芽数和不定芽再生频率均低于东农 50。而且东农 50 的不定芽均比 *GmRAV-i* 大豆的不定芽颜色更绿,愈伤组织更致密。结果表明,RAV 基因干涉后抑制了大豆不定芽的再生。

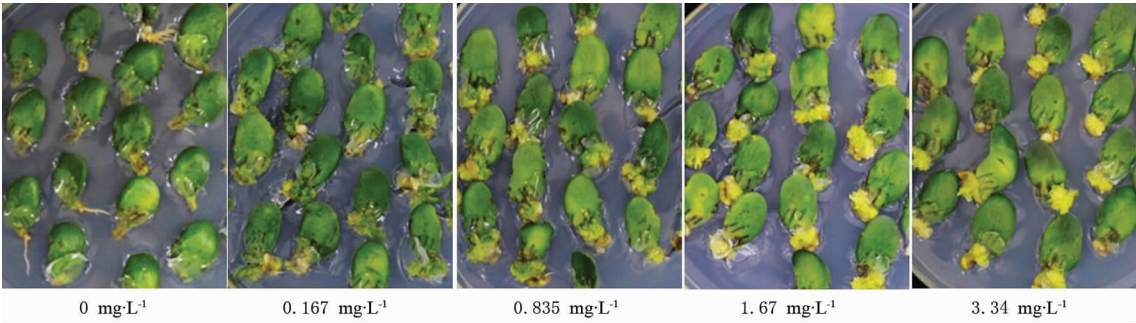


图6 不同浓度的6-BA对大豆东农50不定芽生长的影响

Fig. 6 Effect of various 6-BA concentrations on shoot growth of soybean Dongnong50

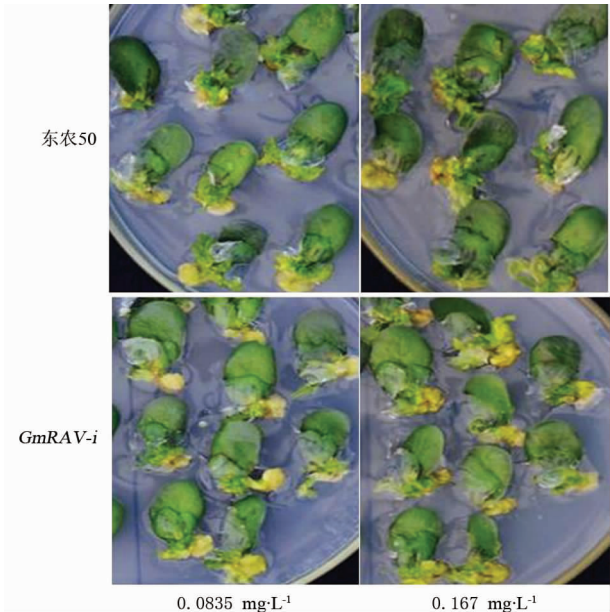


图7 不同浓度的6-BA对GmRAV-i大豆不定芽再生频率的影响

Fig. 7 Effect of various 2-ip concentrations on shoot regeneration rate of GmRAV-i soybean

表2 不同浓度的6-BA对GmRAV-i大豆子叶节外植体不定芽再生的影响

Table 2 Effects of various concentrations of 6-BA on shoot regeneration from cotyledonary nodes explants of GmRAV-i soybean

6-BA 浓度 6-BA concentration /mg·L ⁻¹	平均不定芽数 Shoot number		不定芽再生频率 Shoot regeneration rate/%	
	东农 50 Dongnong50	GmRAV-i	东农 50 Dongnong50	GmRAV-i
0	0	0	0	0
0.0835	17	10	56.67	33.33
0.167	22	14	73.33	46.67

3 讨论

植物组织培养中,植物激素是影响愈伤组织诱导的关键性因素^[11-13]。从理论上讲,6-BA 浓度越高,分化率越高,丛生芽数越多,再生率及转化率也就越高。但丛生芽之间的相互抑制作用导致丛生

芽不易伸长,叶片生长一段时间就发黄、脱落。继 Lazzeri 等^[14] 将丛生芽诱导培养基中 6-BA 浓度确定为 1.0 ~ 3.0 mg·L⁻¹ 以后,许多研究者对生芽诱导培养基中 6-BA 浓度进行了探讨,本研究发现 6-BA 浓度为 0.167 mg·L⁻¹ 时,大豆东农 50 的不定芽再生频率最高,达到 73.33%。以拟南芥 *rav* 突变体的根作为外植体的不定芽再生试验中,适当提高 2-ip 的浓度,有利于拟南芥的根外植体生芽,当 2-ip 浓度为 5 μmol·L⁻¹ 时, *Columbia* 型拟南芥的不定芽再生频率达到 77.5%。

GmRAV^[15-16] (DQ147914) 是大豆基因组中编码 RAV2-like 转录因子的同系物,也是一个具有 AP2/ERF 与 B3 两种 DNA 结合结构域的 *AtRAV2* 家族成员的功能同系物。ERF 的 4 个亚家族转录因子能够增加愈伤组织再生不定芽的能力并且被细胞分裂素诱导^[6],而 *GmRAV* 的表达同样受到了细胞分裂素的上调^[2],因此 *GmRAV* 或许通过细胞分裂素介导不定芽再生。本研究中,拟南芥 *rav* 突变体在 2-ip 的介导下,不定芽的再生频率明显的低于 *Columbia* 型拟南芥; *GmRAV-i* 大豆在 6-BA 的处理下,不定芽的再生频率同样低于大豆东农 50。拟南芥 *rav* 突变体和 *GmRAV-i* 大豆的芽再生试验结果一致,不定芽的再生频率均有降低。表明 *RAV* 基因同系物在不同植物间具有功能保守性,且在细胞分裂素存在下促进不定芽的再生。

参考文献

[1] 程林梅,孙毅,刘少翔. 大豆不同外植体植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报,1998,20(2):21-24. (Cheng L M, Sun Y, Liu S X. Study on the regeneration of various explants of soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(2): 21-24.)

[2] Zhao L, Hao D Q, Chen L M, et al. Roles for a soybean RAV-like orthologue in shoot regeneration and photoperiodicity inferred from transgenic plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2012; 63: 3257-3270.

[3] Che P, Lall S, Nettleton D, et al. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture

- [J]. Plant Physiology, 2006, 141: 620-637.
- [4] Ikeda Y, Banno H, Niu Q W, et al. The enhancer of shoot regeneration 2 gene in *Arabidopsis* regulates cup-shaped cotyledon 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development[J]. Plant and Cell Physiology, 2006, 47: 1443-1456.
- [5] Srinivasan C, Liu Z, Heidmann I, et al. Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Planta, 2007, 225: 341-351.
- [6] Che P, Gingerich D J, Lall S, et al. Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2002, 14: 2771-2785.
- [7] Kakimoto T. CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction[J]. Science, 1996, 274: 982-985.
- [8] Hwang I, Sheen J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction[J]. Nature, 2001, 413: 383-389.
- [9] Sun J, Niu Q W, Tarkowski P, et al. The *Arabidopsis* *AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2003, 131: 167-176.
- [10] Valvekens D, Montagu M V, Van L M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 1988, 85: 5536-5540.
- [11] 葛台明, 余毓君. 小麦花药培养的基因型和培养基效应研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(5): 400-413. (Ge T M, Yu Y J. Effect of genotypes and media on wheat anther culture[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1996, 15(5): 400-413.)
- [12] 叶兴国, 王连铮. 大豆花药愈伤组织的分化及内源激素的分析[J]. 作物学报, 1997, 23(5): 555-561. (Ye X G, Wang L Z. Differentiation of callus and analysis of endogenous hormone in anther culture of soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 1997, 23(5): 555-561.)
- [13] 罗琼, 胡延玉, 周开达. 内源激素对水稻成熟胚培养力的影响[J]. 中国水稻科学, 1998, 12(4): 238-240. (Luo Q, Hu Y Y, Zhou K D. Role of endogenous hormones in tissue culture of mature rice embryo[J]. Chinese Journal of Rice Science, 1998, 12(4): 238-240.)
- [14] Lazzeri P A, Hidebrand D F, Collins G B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean [J]. Plant Molecular Biology, 1985(3): 160-167.
- [15] Zhao L, Luo Q L, Gao Y, et al. A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean [J]. Planta, 2008, 227: 1389-1399.
- [16] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463: 178-183.

(上接第 22 页)

- [16] 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 一个用于甘蓝显性雄性不育基因转育辅助选择的 SCAR 标记[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 143-144. (Wang X W, Fang Z Y, Sun P T, et al. A SCAR marker applicable in marker assisted selection of a dominant male sterility gene in cabbage[J]. Acta Horticulture Sinica, 2000, 27(2): 143-144.)
- [17] 陈沁滨, 侯喜林, 陈晓峰, 等. 洋葱细胞质雄性不育基因 RAPD 及 SCAR 分子标记研究[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(4): 16-19. (Chen Q B, Hou X L, Chen X F, et al. Identification of RAPD and SCAR markers linked to the cytoplasmic male sterility of onion line[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2007, 30(4): 16-19.)
- [18] 李玉秋. 大豆细胞质雄性不育线粒体基因组的比较研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008: 32-34. (Li Y Q. Mitochondrial genome comparison research on soybean cytoplasmic male sterility[D]. Changchun: Jilin University, 2008: 32-34.)
- [19] 任良真, 张春宝, 赵洪锟, 等. 一种改良的快速高质大豆基因组 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报, 2012, 28(9): 38-41. (Ren L Z, Zhang C B, Zhao H K, et al. An improved method to rapid and high-quality of genomic DNA extraction from soybean[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(9): 38-41.)
- [20] 李红双, 李景富, 许向阳. 番茄抗根结线虫病基因的 RAPD 和 SCAR 标记[J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 185-188. (Li H S, Li J F, Xu X Y. Identification of RAPD and SCAR markers linked to root-knot nematode resistant genes in tomato [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(2): 185-188.)
- [21] 王欣, 马代夫, 李强, 等. 甘薯抗茎线虫病基因 SCAR 标记辅助育种初探[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(1): 49-53. (Wang X, Ma D F, Li Q, et al. Initial application of scar markers linked to a gene for stem nematode disease resistance in assisted selection in sweetpotato breeding[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2009, 25(1): 49-53.)
- [22] 丁俊杰, 文景芝, 束永俊, 等. 两个大豆灰斑病抗性相关 SCAR 标记的发现与鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(12): 1-5. (Ding J J, Wen J Z, Shu Y J, et al. Discovery and identification of two SCAR related markers resistance to soybean frog-eye leaf spot [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(12): 1-5.)
- [23] 王成, 曹后男, 宗成文, 等. 桃花粉可育基因连锁的 RAPD 标记与 SCAR 标记的转化[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 865-870. (Wang C, Cao H N, Zong C W, et al. Identification of RAPD marker linked to pollen fertility gene and conversion to SCAR marker in peach[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(4): 865-870.)
- [24] Kadowaki K, Suzuki T, Kazama S. A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male sterility of rice [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1990, 224: 10-16.
- [25] Kohler R H, Horn R, Lossl A, et al. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene[J]. Molecular Genetics and Genomics, 1991, 227: 369-376.
- [26] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development[J]. Plant Cell, 2004, 16: 154-169.
- [27] Kim B D, Kim D H. Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility associated *orf456* gene of chili pepper [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63: 519-532.