

利用抑制消减杂交技术分离辣椒细胞质雄性不育育性恢复相关 EST

郭 爽, 沈火林*, 杨文才, 杨 娟, 王 雯

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘 要: 以辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 细胞质雄性不育系 23A、121A, 和其相应的近等基因恢复系 23C、121C 为试验材料, 利用抑制消减杂交 (SSH) 技术成功构建了 CMS 恢复基因诱导表达的消减 cDNA 文库。结合高密度点阵膜杂交差异筛选, 获得了 282 个阳性克隆。通过测序, 除去重复序列共得到 175 个 Unique ESTs。在 GenBank 上进行 BLAST 分析, 55 个 EST 片段未找到对应的同源序列, 可能代表了新基因; 120 个 EST 片段找到了对应的同源序列, 包括 103 个已知功能基因和 17 个未知功能基因。按照 MIPS 功能分类法, 将其分为 14 个功能组, 涉及代谢、胁迫应答、蛋白活性、转录因子、信号转导等多方面的功能。

关键词: 辣椒; 细胞质雄性不育; 恢复基因; 抑制消减杂交; 差异表达

中图分类号: S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 10-1443-07

Isolation of Fertility Restoration-related ESTs in Pepper Cytoplasmic Male Sterility Lines Using SSH

GUO Shuang, SHEN Huo-lin*, YANG Wen-cai, YANG Juan, and WANG Wen

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To isolate fertility restoration-related genes in pepper cytoplasmic male sterility (CMS) lines, a forward subtracted cDNA library was constructed using suppression subtractive hybridization (SSH). The cDNA of pepper CMS line 23A and 121A were used as driver and near-isogenic restorer line 23C and 121C as tester. Genes differentially expressed were screened using dot blot hybridization. A total of 175 non-redundant expressed sequence tags (ESTs) were identified. The genes' potential function analysis showed that 103 of these genes were homologous to known genes, and 55 could be new genes. The ESTs were sorted into 14 functional categories according to the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) method.

Key words: pepper; cytoplasmic male sterility; restorer gene; suppression subtractive hybridization; differential expression

已有研究表明植物细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 中恢复基因对不育基因相关区域的作用至少有转录水平和翻译水平调控两种方式 (Gray et al, 1992)。恢复基因的一种作用方式可能是编码一种 RNA 加工酶, 通过在转录水平影响不育相关区域转录本的加工、编辑, 进而导致蛋白谱的差异, 引起育性恢复。另外一种作用方式可能是编码一种蛋白质酶, 通过减少不育基因编码的蛋白质积累量而引起育性的恢复。虽然这些假说都能从某一方面解释育性恢复机理, 但都没有令人信服的直接证据。辣椒 CMS 恢复基因主要分布在辣椒味较浓的小果形辣椒材料中, 大果形辣椒和甜椒中相对较少 (王述彬等, 2007), 其育性恢复力呈连续分布的数量性状特点。Wang 等 (2004) 已

收稿日期: 2009 - 04 - 30; 修回日期: 2009 - 07 - 06

基金项目: 国家 '863' 计划项目 (2006AA10Z1A6); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A7, 2008BADB1B04); 北京市教委共建项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: SHL1606@cau.edu.cn)

将辣椒 CMS主效恢复基因定位在第 6 条染色体上, 并且找到了 4 个微效 QTLs, 以及位于主效恢复基因两侧的 2 个 RAPD 标记 (Zhang et al, 2000)。

抑制消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 技术 (Diatchenko et al, 1996) 是一种比较和分离不同细胞系、不同组织或同一细胞系同一组织在不同条件下差别表达基因的方法, 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等方面的研究。目前 SSH 技术在植物上的应用主要包括两个方面 (孙常青等, 2007), 一方面涉及植物的生长发育及组织特异性研究; 另一方面, 在植物抵抗各种生物和非生物胁迫的研究中, SSH 技术用于分离生物和非生物诱导表达的相关基因。

本研究旨在通过 SSH 技术, 分离获得在辣椒恢复系中特异表达、与 CMS 育性恢复基因相关的 cDNA 片段, 从中筛选出与育性恢复相关的基因, 通过基因功能注释及分类分析, 初步了解辣椒 CMS 育性恢复涉及基因的功能、种类及数量, 为恢复系相关基因的表达特性分析、功能鉴定以及揭示辣椒 CMS 育性恢复的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以辣椒细胞质雄性不育系 23A、121A 及其相应的近等基因恢复系 23C、121C 为试验材料, 分别作为构建消减文库的驱动方 (driver) 和试验方 (tester)。23A 和 23C 由早熟甜椒自交系转育而成, 单果质量 150 g 左右, 纵径约 10 cm, 横径 7 cm; 121A 和 121C 是从湖南地方品种 ‘伏地尖’ 中选出的自交系转育而成, 单果质量 40 g 左右, 纵径约 15 cm, 横径 3 cm。两份不育系均是以 8907A (沈火林, 1994) 为不育源经连续回交 7 代以上转育成的 100% 不育的不育系, 两份不育系的细胞质来源完全相同。恢复系是由 8907A × ‘大金条’ (含恢复基因, 为单基因显性遗传) 组合再与 23、121 号自交系连续回交 6 代以上转育而成, 两份恢复系与对应的不育系细胞质均来源于 8907A, 细胞核中除了恢复基因位点以外其余遗传背景完全相同。不育系与相应的恢复系为近等基因系。2008 年春季在中国农业大学上庄实验站大棚内常规种植。在开花期取花瓣已开始变白的花蕾, 剥取花药立即用液氮冷冻并在 -80℃ 保存。

1.2 总 RNA 的提取与 mRNA 的分离

分别取每份材料的恢复系和不育系花药, 液氮研磨, 采用 Trizol 试剂 (中国普博欣公司) 提取总 RNA。然后分别将两份材料的不育系 (23A、121A) 和恢复系 (23C、121C) 的总 RNA 等量混合, 按照 polyA Trac[®] mRNA isolation system kit (美国 Promega 公司) 操作说明书分离 mRNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 抑制消减杂交 (SSH)

抑制消减杂交依照 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (美国 Clontech 公司) 操作说明书进行。以辣椒细胞质雄性不育恢复系为消减杂交的试验方, 不育系作为驱动方。分别取 2 μg mRNA 为起始量, 经过 cDNA 双链合成, *Rsa* 酶切消化, 两端连接特殊接头, 正反向两次消减杂交和两次选择性 PCR 扩增后, 富集了大量差异表达基因片段。

1.4 消减 cDNA 文库构建及差异筛选

将 SSH 第 2 次 PCR 产物纯化后, 与 pGEM-T Easy 载体 (美国 Promega 公司) 连接。连接产物用热激法转化到 *E. coli* DH5 感受态细胞 (中国天根公司) 中, 在氨苄青霉素平板上进行阳性克隆筛选。

挑取白斑菌落在氨苄青霉素液体培养基中 37℃ 振荡过夜培养, 用巢式引物 1 (5'-TCGAGCGGC-CGCCCCGGCAGGT-3') 和 2R (5'-AGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3') 进行 PCR, 2% 的琼脂糖凝胶电

泳检测。PCR产物进行点阵膜杂交, 分别以正向消减杂交 cDNA 和反向消减杂交 cDNA 为探针, 差异筛选探针用地高辛标记, 与高密度点阵膜杂交, 杂交方法按照美国罗氏公司地高辛核酸标记指示系统试剂盒进行。

1.5 差异表达基因测序与序列分析

点阵膜杂交后获得的阳性克隆, 送到北京三博远志生物技术有限责任公司测序, 以 SP6 为测序引物, 测序结果去除载体和接头序列, 得到每个克隆的 EST 序列。将所有的 ESTs 在 NCBI 的网站上进行 BLAST 比对, 比对结果按 MIPS 分类法, 将比对结果 E 值低于 $1e-05$ 的 ESTs 进行功能分类分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 与 mRNA 的检测

不育系和恢复系的总 RNA 与 mRNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 总 RNA 集中在 18S 与 28S 区域, 且二者条带的亮度比值接近 2:1, 表明其完整性好, 降解甚微, 可进一步用于提取 mRNA。纯化的 mRNA 呈现弥散条带, 且在 18S 与 28S 处有隐约主带, 说明 mRNA 质量良好, 可用于构建文库。

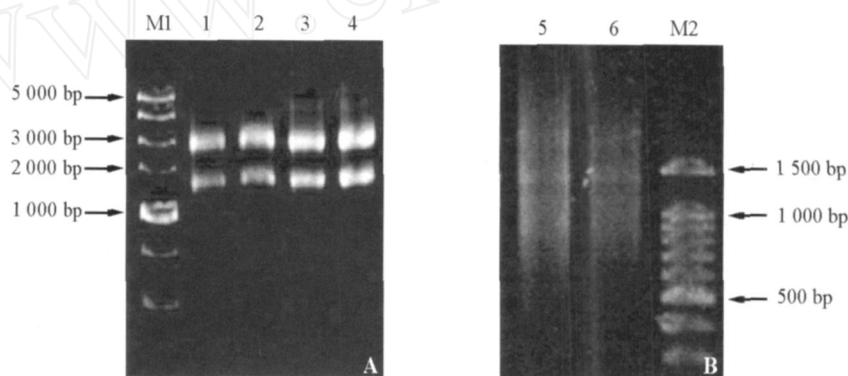


图 1 辣椒 CMS 恢复系和不育系花药总 RNA (A) 和 mRNA (B) 的电泳检测

M1: DL5000 DNA marker; 1: 23A; 2: 121A; 3: 23C; 4: 121C; 5: 恢复系; 6: 不育系; M2: 100 bp DNA ladder.

Fig 1 Gel electrophoresis for checking the quality of total RNA (A) and mRNA (B) extracted from anther tissue of pepper

M1: DL5000 DNA marker; 1: 23A; 2: 121A; 3: 23C; 4: 121C; 5: restorer line; 6: CMS line; M2: 100 bp DNA ladder

2.2 SSH 结果分析

抑制消减杂交第 2 次 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上的检测结果如图 2 所示, 试剂盒中提供对照骨骼肌第 2 次消减 PCR 产物与对照骨骼肌 marker 完全吻合, 说明 PCR 扩增体系是可靠的。正向消减产物经过两次 PCR 后扩增出较短的弥散带, 且有明显主带出现, 而未消减产物扩增出较长的弥散带, 主带不清晰, 说明组成性表达的基因已经进行了很好的均衡和消减, 达到了去除高丰度基因, 大量富集恢复基因诱导表达的 cDNA 片段的目的。

2.3 差异筛选消减 cDNA 文库构建

随机挑取消减文库中阳性克隆, 利用巢式引物进行 PCR, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 3 所示, 获得克隆片段主要集中于 200~1000 bp 范围内, 符合建库要求。对获得的 PCR 阳性克隆片段进行高密度点阵膜杂交 (Zheng et al, 2004), 可以与正向消减探针杂交, 不能与反向消减探针杂交, 即正向杂交点信号强于反向杂交点信号的克隆就是差异表达基因, 对应杂交点信号强度相同或反向杂交信号强于正向信号的视为假阳性克隆 (图 4)。通过两个标记探针的两次重复杂交, 最后从 461 个克隆中选定了 282 个具有差异表达的阳性克隆。

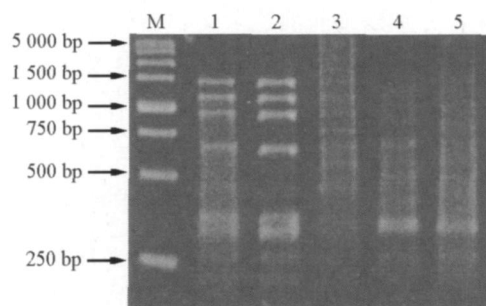


图2 抑制消减杂交第2次 PCR 产物分析

M: DL5000 DNA marker; 1: 对照骨骼肌 marker; 2: 消减骨骼肌 PCR 产物;
3: 未消减骨骼肌 PCR 产物; 4: 正向消减 PCR 产物; 5: 正向未消减 PCR 产物。

Fig. 2 The second PCR products after SSH

M: DL5000 DNA marker; 1: ϕ X174/Hae III digest size markers; 2: Second PCR products of subtracted skeletal muscle; 3: Second PCR products of unsubtracted skeletal muscle;
4: Second PCR products of forward subtraction; 5: Second PCR products of forward unsubtraction.

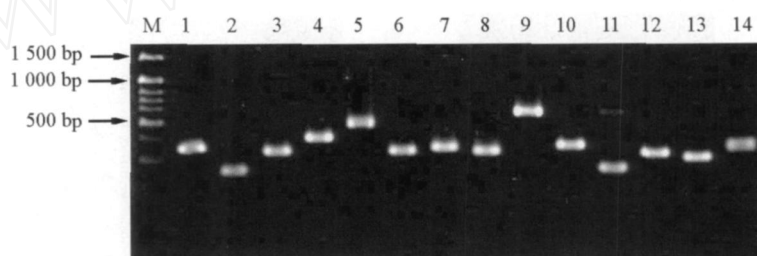


图3 消减文库阳性克隆 PCR 扩增检测

M: 100 bp DNA ladder; 1~14: 随机挑取的阳性克隆 PCR 扩增。

Fig. 3 PCR analysis of partial clones from the subtracted library

M: 100 bp DNA ladder; 1~14: PCR products from different clones.

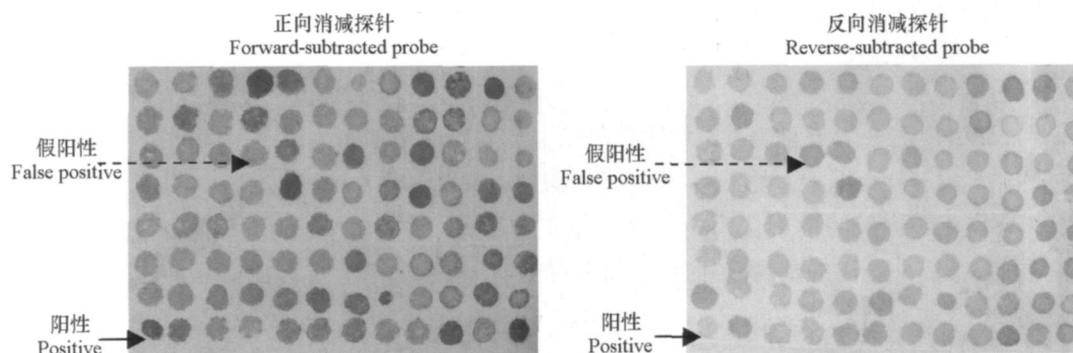


图4 部分克隆差异筛选结果

Fig. 4 Partial results of differential screening subtracted cDNA library

2.4 序列分析

将通过差异筛选消减 cDNA 文库得到的 282 个阳性克隆全部测序, 最后得到 269 个 EST 序列。利用 Stackpack program 进行 EST cluster 分析, 269 个 EST 总共代表了 175 个 Unique ESTs, 其中包括 139

个 singletons和 36个 contigs 在 NCB I 上进行 BLAST 比对, 比对结果中 E 值低于 $1e-05$ 的 ESTs 被视为已知基因, 共 120 个, 占全部 EST 的 68.6%, 包括 17 个未知功能基因和 103 个已知功能基因。与其他物种同源性较低, 或者没有有意义的比对结果的 ESTs 所代表的可能是新基因, 共 55 个, 占 31.4%。在这 120 个已知基因中, 包括了一些已经报道的与花粉发育相关的基因, 如花粉变应原 (pollen allergen Cro s 1) (Lee et al, 2008)、花同源异型蛋白 (floral homeotic protein) (Kush et al, 1993)、果胶甲酯水解酶 (pectin methylesterase) (Bosch et al, 2005) 等, 在这一程度上证明了所构建消减文库的可靠性。这些同源基因中, 45.6% 来自茄科植物 (表 1), 14.6% 来自辣椒, 21.0% 来自拟南芥, 9.5% 来自烟草。

表 1 部分测序克隆的 BLAST 结果

Table 1 BLAST search results of some sequenced ESTs

克隆 Clone No	长度 /bp Length	同源比对结果 Result	来源 Source	E 值 Expect
TA136	594	过敏反应帮助蛋白 Hypersensitive response assisting protein	<i>Capsicum annuum</i>	2e-86
TA143	450	胞溶质蛋白 Cyclophilin	<i>Capsicum annuum</i>	7e-49
TA216	264	泛素结合蛋白 Ubiquitin-conjugating protein	<i>Capsicum annuum</i>	2e-04
TA253	490	硫氧还蛋白过氧化物酶 Thioredoxin peroxidase	<i>Capsicum annuum</i>	4e-70
TA272	351	泛素结合酶 Ubiquitin-conjugating enzyme 8	<i>Capsicum annuum</i>	2e-63
TA316	340	超氧化物歧化酶 Putative Cu/Zn superoxide dismutase	<i>Capsicum annuum</i>	2e-27
TB5	289	谷酰胺合成酶 Glutamine synthetase gln1-3	<i>Capsicum annuum</i>	3e-48
TB21	417	腺苷甲硫氨酸合成酶 Putative S-adenosylmethionine synthetase	<i>Capsicum annuum</i>	6e-65
TF32	329	延长因子 1- Elongation factor 1-alpha	<i>Capsicum annuum</i>	6e-08
30	339	谷胱甘肽过氧化物酶 Putative glutathione peroxidase	<i>Capsicum chinense</i>	2e-18
TA134	308	核糖体蛋白 60S Ribosomal protein L37a	<i>Capsicum chinense</i>	4e-19
TA213	296	谷胱甘肽转移酶 Glutathione S-transferase 12	<i>Capsicum chinense</i>	2e-81
TC1	574	谷胱甘肽转移酶 Glutathione S-transferase/oxidase	<i>Capsicum chinense</i>	8e-58
TE5	250	根瘤相关蛋白 Tumor-related protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	7e-08
TF2	461	胞浆苹果酸脱氢酶 Cytosolic malate dehydrogenase	<i>Solanum lycopersicum</i>	4e-31
TG46	353	脱氢酶 Putative dehydrogenase	<i>Solanum lycopersicum</i>	4e-43
TH5	493	ATP酶蛋白脂质亚基 Vacuolar proton ATPase proteolipid subunit	<i>Solanum lycopersicum</i>	3e-29
TA22	282	真核翻译起始因子 Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	7e-32
21	302	酸性磷酸酶 Probable pectate lyase P59 precursor	<i>Solanum lycopersicum</i>	7e-29
TA219	443	七跨膜结构域蛋白 Seven-transmembrane-domain protein 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	1e-30
TA271	273	14-3-3 蛋白 14-3-3 protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	2e-41
TB4	557	真核类型碳酸酐酶 C 家族蛋白 Eukaryotic-type carbonic anhydrase family protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	6e-60
TE25	654	腺苷甲硫氨酸脱羧酶 S-adenosylmethionine decarboxylase	<i>Solanum lycopersicum</i>	4e-110
TF27	406	聚合蛋白 Putative gagpol polypeptide	<i>Solanum lycopersicum</i>	2e-18
TG47	483	葡萄糖苷酶 Beta-glucosidase 08	<i>Solanum lycopersicum</i>	4e-31
TA162	542	水通道蛋白 Similar to aquaporin	<i>Solanum lycopersicum</i>	2e-72
TA166	548	抗程序性细胞死亡蛋白 Putative anti-PCD protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	2e-14
TA267	430	细胞壁转移酶 Cell wall invertase	<i>Solanum lycopersicum</i>	4e-31
TH6	522	EF 家族蛋白 EF hand family protein	<i>Solanum demissum</i>	6e-20
TA15	513	豌豆球蛋白 Putative vicilin	<i>Solanum demissum</i>	1e-25
TA281	403	BR II 蛋白 BR II protein	<i>Solanum tuberosum</i>	7e-40
TD4	291	倍半萜环化合成酶 Vetispiradiene synthase	<i>Solanum tuberosum</i>	2e-21
TD7	332	脂肪氧合酶 13-lipoxygenase	<i>Solanum tuberosum</i>	2e-54
TE38	533	核糖体蛋白 Ribosome-associated protein p40-like	<i>Solanum tuberosum</i>	3e-61
TG19	918	抗菌肽 Snakin-1	<i>Solanum tuberosum</i>	8e-30
TG20	314	酸性转化酶 Acid invertase	<i>Solanum tuberosum</i>	6e-34
TG8	475	核糖体蛋白 60S Ribosomal protein L7A-like	<i>Solanum tuberosum</i>	1e-62
46	676	细胞质葡萄糖磷酸变位酶 Phosphoglucosmutase, cytoplasmic	<i>Solanum tuberosum</i>	4e-117
TA217	311	核糖体蛋白 60S Ribosomal protein L10-like protein	<i>Solanum tuberosum</i>	3e-53
TA214	432	矮牵牛发芽花粉 NH20 Petunia germination pollen NH20	<i>Petunia xhybrida</i>	1e-24
TA280	296	矮牵牛发芽花粉 NH19 Petunia germination pollen NH19	<i>Petunia xhybrida</i>	5e-26
TC12	323	矮牵牛芽花粉 D7 Petunia germination pollen D7	<i>Petunia xhybrida</i>	8e-15
TD16	400	花同源异型蛋白 Floral homeotic protein	<i>Petunia xhybrida</i>	1e-58
TD29	665	半乳糖苷酶前体 Beta-galactosidase 2 precursor	<i>Petunia xhybrida</i>	2e-107
TA228	207	转录因子 DEF	<i>Mandragora autumnalis</i>	4e-31

2.5 功能分类

将视为已知基因的 103 个 ESTs 按 MIPS 功能分类法 (师红雯和黄原, 2006) 将其分为 14 大类, 包括基础代谢、胁迫应答、蛋白活性、转运、翻译、发育、信号转导等 (表 2), 参与到植物细胞生命活动的各个方面。其中, 参与基础代谢的 ESTs 最多, 共 15 个。半乳糖苷酶前体、胞浆苹果酸脱氢酶、细胞质葡糖磷酸变位酶等参与了碳水化合物代谢过程; 羧酸酯酶、磷酸二酯酶等参与了脂质代谢; 谷氨酸脱羧酶、谷胱甘肽转移酶等参与了蛋白代谢。参与胁迫应答的 ESTs 有 11 个, 包括对冷害、热害、干旱、盐胁迫等的胁迫应答反应。有 5 个 ESTs 参与了植物发育过程, 涉及花发育、胚胎发育以及器官发育。8 个转运因子涉及质子转运、糖转运、脂质转运、蛋白转运、离子转运等。另外, 有 8 个 ESTs 生物学功能未知; 14 个 ESTs 与拟南芥数据库没有匹配结果。

表 2 103 个 ESTs 功能分类及比例

Table 2 Percentage distribution of the isolated 103 ESTs based on the functional classes

功能分类	Functional class	数量	Number	比例	% Percent
基础代谢	Primary metabolism	15		14.6	
胁迫应答	Stress response	11		10.8	
蛋白活性	Protein activity	10		9.7	
翻译	Translation	9		8.7	
转运	Transport	8		7.8	
发育	Development	5		4.9	
蛋白结合	Protein binding	5		4.9	
信号转导	Signal transduction	4		3.9	
蛋白折叠	Protein folding	3		2.9	
信号转导	Signal transduction	3		2.9	
细胞命运	Cell fate	2		1.9	
其它	Others	6		5.8	
未知功能	Function unknown	8		7.8	
未找到	Not found	14		13.6	

3 讨论

辣椒 CMS 类型已鉴定出有关的线粒体基因 (Kim et al, 2007), 但相关的核育性恢复基因的分离克隆研究较少 (刘忠松等, 2001), 本研究从辣椒 CMS 育性恢复相关基因入手, 利用 SSH 技术分离辣椒 CMS 育性恢复相关 ESTs, 构建辣椒 CMS 育性恢复相关 cDNA 文库, 为进一步对辣椒育性恢复相关基因进行深入研究奠定基础。同时, 试验材料中不育系与相应的恢复系为近等基因系, 这在理论上保证了获得的差异表达基因仅与恢复基因位点有关。

综合整个消减 cDNA 文库分析, 可以看到雄性不育恢复基因诱导表达的相关基因涉及花粉发育、信号传递、转录调控、基础代谢以及保护机制等多个方面。在获得的 ESTs 中, *DEFICIENS* (*DEF*) 为植物花器官发育 B 类基因, 控制双子叶植物花瓣和雄蕊的发育, 属于 MADS-box 基因家族, 编码转录因子。这些基因的突变能导致花瓣转变为萼片, 雄蕊转变为心皮。MADS-box 是一个保守性很强的 DNA 结合结构域, 在植物花器官发育中 MADS-box 蛋白基因起着非常重要的作用 (Irish, 2003)。蛋白质可逆磷酸化是细胞内普遍存在的一种共价修饰生理调节反应, 受蛋白激酶和蛋白磷酸酶的调节。蛋白磷酸酶是具有催化已经磷酸化的蛋白质分子发生去磷酸化反应的一类酶分子, 与蛋白激酶相对应存在, 共同构成了磷酸化和去磷酸化这一重要的蛋白质活性的开关系统, 是真核细胞信号转导的共通路, 其动态变化几乎涉及从胚胎发育到个体成熟的所有过程。雌蕊中发出的化学信号、电信号或物理信号等诱导花粉萌发、花粉管生长, 调节花粉管伸长的方向性, 这一过程中蛋白质可逆磷酸化起着重要的信号转导作用 (Hardin & Wolniak, 2001)。越来越多的证据表明, 蛋白磷酸酶也是花粉萌发和花粉管极性顶端生长所必需的 (Gupta et al, 2002), 同时在花粉和柱头细胞之间的识别, 胞外信号转化为胞质信息过程中起着重要的信号转导作用 (Obemeyer et al, 1998)。另外, 在筛选到的 EST 中, 频繁出现与矮牵牛花粉萌发 (petunia geminating pollen, PGP) 同源性很高的序列, 包括 NH20、NH19、D7 等多种类型, 这些类型在矮牵牛花粉萌发前后以及不同器官上的转录本丰度差别很大 (Guyon et al, 2000), 推测其可能在花粉发育、花粉管伸长以及花粉和柱头的识别中担当不同角色。同时, 在试验中还筛选到了许多在花粉发育过程中没有报道的 ESTs, 如抗性蛋白, 细胞程序性死亡因子、豌豆球蛋白、跨膜结构域蛋白等。而试验中分离的许多功能未知的基因可能是一些新的与花粉

发育有关的基因,有待后续进行深入研究。

植物雄配子的发育是一系列有序的生理生化变化过程,是基因间相互作用的结果。在这一过程中,这些基因是如何相互作用的,到底哪些基因起主导作用,需要对每一个基因的功能做深入细致的研究。这些恢复基因诱导 EST 序列的获得,为今后研究育性恢复关键基因打下了良好的基础。

References

- Bosch M, Cheung A Y, Hepler P K. 2005. Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiology*, 138 (3): 1334 - 1346.
- Diatchenko L, Lauau Y F C, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Silebert P D. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (12): 6025 - 6030.
- Gray M W, Hanic-Joyce P J, Covello P S. 1992. Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 145 - 175.
- Gupta R, Ting J T L, Sokolov L N, Johnson S A, Luan S. 2002. A tumor suppressor homolog, *AtPTEN1*, is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14 (10): 2495 - 2507.
- Guyon V N, Astwood J D, Gamer E C, Dunker A K, Taylor L P. 2000. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in *Petunia*. *Plant Physiology*, 123 (2): 699 - 710.
- Hardin S C, Wolniak S M. 2001. Expression of the mitogen-activated protein kinase kinase ZmMEK1 in the primary root of maize. *Planta*, 213 (6): 916 - 926.
- Irish F V. 2003. The evolution of floral homeotic gene function. *BioEssays*, 25 (7): 637 - 646.
- Kush A, Brunelle A, Shevell D, Chua N H. 1993. The cDNA sequence of two MADS box proteins in *Petunia*. *Plant Physiology*, 102 (3): 1051 - 1052.
- Kim D H, Kang J G, Kim B D. 2007. Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated *orf456* gene of chili pepper. *Plant Molecular Biology*, 63 (4): 519 - 532.
- Lee C B, Swatek K N, McClure B. 2008. Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana glauca* pistil arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (40): 26965 - 26973.
- Liu Zhong-song, Guan Chun-yun, Chen She-yuan. 2001. Mechanism of plant male sterility and its application. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese).
- 刘忠松, 官春云, 陈社员. 2001. 植物雄性不育机理的研究及应用. 北京: 中国农业出版社.
- Obemeyer G, Klaushofer H, Nagl M, Hofberger M, Bentrup F. 1998. *In vitro* germination and growth of lily pollen tubes is affected by protein phosphatase inhibitors. *Planta*, 207 (2): 303 - 312.
- Shen Hou-lin, Jiang Jian-zhen, Wang Zhi-yuan, Geng San-sheng. 1994. Studies on the breeding and inheritance of male sterile lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis*, 20 (1): 25 - 30. (in Chinese).
- 沈火林, 蒋健箴, 王志源, 耿三省. 1994. 辣椒雄性不育系选育及遗传研究. 北京农业大学学报, 20 (1): 25 - 30.
- Shi Hong-wen, Huang Yuan. 2006. The functional classification system of gene products. *Chemistry of Life*, 26 (4): 366 - 369. (in Chinese).
- 师红雯, 黄原. 2006. 基因产物功能分类系统. 生命的化学, 26 (4): 366 - 369.
- Sun Chang-qing, Shi Jun-feng, Guo Zhi-li, Liu Ye-feng. 2007. Study of the suppression subtractive hybridization and the gene different expression in plant. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 35 (4): 38 - 41. (in Chinese).
- 孙常青, 施俊凤, 郭志利, 刘烨锋. 2007. 抑制差减杂交法 (SSH) 及其在植物中的应用. 山西农业科学, 35 (4): 38 - 41.
- Wang Li-hao, Zhang Bao-xi, Lefebvre V, Huang San-wen, Daubeze A M, Palloix A. 2004. QTL analysis of fertility restoration in cytoplasmic male sterile pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (5): 1058 - 1063.
- Wang Shu-bin, Liu Jin-bin, Pan Bao-gui. 2007. Inheritance and distribution of fertility restoring gene of cytoplasmic male sterile pepper. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 22 (1): 86 - 89. (in Chinese).
- 王述彬, 刘金兵, 潘宝贵. 2007. 辣(甜)椒细胞质雄性不育恢复基因的遗传与分布. 华北农学报, 22 (1): 86 - 89.
- Zhang Bao-xi, Huang San-wen, Yang Guimei, Guo Jia-zhen. 2000. Two RAPD markers linked to a major fertility restorer gene in pepper. *Eu-phytica*, 113 (2): 155 - 161.
- Zheng Jun, Zhao Jin-feng, Tao Ya-zhong, Wang Jian-hua, Lin Yun-jun, Fu Jun-jie, Jin Ying, Gao Peng, Zhang Jin-peng, Bai Yun-feng, Wang Guo-ying. 2004. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA microarray. *Plant Molecular Biology*, 55: 807 - 823.