

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00771

## 红莲型水稻杂种F<sub>1</sub>花药噬菌体展示文库的构建

胡朝凤, 彭晓珏, 周杨永, 谭艳平, 李绍清, 朱英国

武汉大学生命科学学院, 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072

**摘要:** 噬菌体展示是研究蛋白质相互作用的重要手段, 为深入研究红莲型水稻不育和育性恢复的分子机理, 以红莲型水稻杂种F<sub>1</sub>花药为材料, 分离纯化mRNA, 经反转录合成双链cDNA, 在双链cDNA 末端加上定向EcoR /Hind 接头, 再用EcoR 和Hind 消化接头, 形成两端分别带有EcoR 和Hind 粘性末端的双链cDNA。经Mini Column 纯化后, 收集 300 bp 以上的双链cDNA 片段, 将其连接到带有EcoR 和Hind 末端的T7 Select 10-3b 载体上, 经体外包装后, 以BL T5403 为受体菌构建了红莲水稻杂种F<sub>1</sub>花药的噬菌体展示文库。经测定显示, 该噬菌体展示文库容量为  $1.03 \times 10^6$  pfu/mL, 重组率为 100%, 扩增后文库滴度为  $2.14 \times 10^{12}$  pfu/mL。对随机挑取的 100 个噬菌斑进行PCR 鉴定, 97%的插入片段大于 300 bp。

**关键词:** 水稻; 花药; 噬菌体展示; 文库构建

## Construction of T7 phage display library from the anther of Honglian hybrid line of rice

HU Chao-Feng, PENG Xiao-Jue, ZHOU Yang-Yong, TAN Yan-Ping, LI Shao-Qing, ZHU Ying-Guo

Key Laboratory of MOE for Plant Development Biology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China

**Abstract:** Phage display is a powerful method to study protein-protein interactions. In order to study the molecular mechanism of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in Honglian rice, the mRNA was isolated with PolyA Tract mRNA Isolation Kit from the anther of F<sub>1</sub> hybrid rice and the double strand (ds) cDNA was synthesized by reverse transcription. Then the directional EcoR /Hind linkers were ligated into the ends of ds cDNA and the ds cDNA was further digested with EcoR and Hind , which resulted in ds cDNA with EcoR and Hind ends. The digested ds cDNA fragments longer than 300 bp in length were fractionated with Mini Column, then ligated into the T7 Select 10-3b vector with EcoR and Hind ends. After packaging *in vitro*, the T7 Select 10-3b vector was transformed into BL T5403 to construct the T7 phage display library. Analysis showed that the library contained  $1.03 \times 10^6$  clones per microliter, and approximately 100% of the clones in library was recombinant. The titer of the amplified library was  $2.14 \times 10^{12}$  pfu/mL, and the insert length of the recombinants over 300 bp was about 97%.

**Keywords:** rice (*Oryza sativa* L.); anther; T7 phage display; library construction

收稿日期: 2007-11-23; 修回日期: 2008-01-26

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30571144)和国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10A103)资助[Supported by the National Natural Science Foundation (No.30571144) and Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program) of China (No.2006AA10A103)]

作者简介: 胡朝凤(1981-), 女, 在读博士生, 研究方向: 植物发育遗传。E-mail: phenixfeng@yahoo.com.cn

通讯作者: 李绍清(1966-), 男, 副教授, 研究方向: 植物发育遗传。E-mail: shaoqingli@whu.edu.cn

在高等植物中, 雄性不育是一个普遍的自然现象<sup>[1-3]</sup>, 它不仅是农作物杂种优势利用的基础, 具有重要的生产利用价值, 另一方面, 它又是研究细胞质遗传、核质互作和花药发育的极好材料<sup>[4]</sup>。因此, 近年来成为植物遗传育种和分子生物学研究的一大热点。

虽然我国水稻杂种优势利用一直保持世界领先水平, 但是关于水稻细胞质雄性不育(Cytoplasmic male sterility CMS)及其育性恢复的机理研究还相对滞后, 许多问题仍有待深入探索。在包台型、红莲型和野败型 3 种CMS水稻分子机理的研究中, 包台型的研究相对较为深入。Wang等<sup>[5]</sup>认为包台的两个恢复基因*Rfla*、*Rflb*含有多个重复的PPR结构域, 它们通过未知的方式剪切或者降解线粒体*atp6-orf79* 共转录本<sup>[6,7]</sup>, 阻止毒性蛋白ORF79的产生, 从而恢复不育系的育性。虽然从花药败育类型看, 包台为染败, 红莲为圆败, 败育类型不同。但是, Yi等<sup>[8]</sup>发现HL-CMS水稻和包台型一样存在一个与*atp6* 共转录但只有 5 个碱基差异的嵌合线粒体基因*orfH79*, 而*orfH79* 与*atp6* 共转录本之间的连接序列以及表达水平和包台又有一些不同<sup>[9,10]</sup>。那么红莲型水稻的不育及育性恢复的分子机制和包台存在哪些异同, 又有哪些分子通过什么样的信号途径参与其中, 就需要我们采用新的技术和方法进行进一步的研究和验证。

噬菌体展示技术是近年来建立和发展起来的利用噬菌体表达外源基因的一项新技术<sup>[11]</sup>, 在动物、微生物学研究中使用比较广泛, 在植物雄性不育研究中还未涉及。该技术可以用来筛选针对几乎任何靶标(蛋白、DNA、RNA)的亲性和多肽, 它主要应用于研究蛋白相互作用(例如激素、抗体、受体)<sup>[12,13]</sup>、酶分析、DNA-蛋白相互作用、RNA-蛋白相互作用、抗原决定簇作图和突变分析等方面<sup>[14-17]</sup>。因此, 本实验希望通过构建红莲杂种F<sub>1</sub>花药的噬菌体展示文库, 为以后利用不育候选基因*orfH79* 以及恢复候选基因为靶标, 筛选与不育及育性恢复相关的分子, 深入了解不育以及恢复的分子机理, 进一步研究恢复基因对不育基因的调控机理、作用方式等提供可靠的技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

#### 1.1.1 材料种植

2006 年夏, 红莲型杂交水稻红莲优 6 号种植在武汉大学校内试验基地, 一般栽培管理。生长约 90

天左右, 当幼穗分化进入单核早期, 选取长势较好的红莲优 6 号的幼穗, 在 4℃ 剥取花药, 称 4 g 花药, 在液氮中充分研磨, -80℃ 冻存或者直接用于下一步总 RNA 的提取。

#### 1.1.2 主要试剂

Trizol Reagent 为 Invitrogen 公司产品, PolyAtract mRNA Isolation Kit 为 Promega 公司产品, Orient Express Random Primer cDNA Synthesis Kit 和 T7 Select 10-3b Cloning Kit 为 Novagen 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取

取研磨好的花药, 加入 40 mL Trizol, 迅速震荡, 混合均匀, 室温放置 5 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清。加入 4 mL 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 静置 3 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。将水相转移到一新管中, 加入 10 mL 异丙醇, 混匀后室温静置 5 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入 1 mL 75%乙醇, 4℃ 7 500 r/min 离心 5 min。弃上清, 空气干燥 5 min, 溶于 100 μL 无 RNA 酶的水中。用紫外分光光度法测定总 RNA 浓度, 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。

#### 1.2.2 mRNA 的分离纯化

按照 PolyA Tract mRNA Isolation Kit 说明书分离纯化 mRNA, 用紫外分光光度法测定 mRNA 浓度, 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 的质量。

#### 1.2.3 cDNA 的合成及末端平端化

按照Orient Express Random Primer cDNA Synthesis Kit说明书合成双链cDNA。cDNA第 1 链的合成: 取 4 μg mRNA 作为模板, 加入 1 μg随机引物, 在MMLV 反转录酶作用下利用甲基化的dNTP完成第 1 链的合成。cDNA 第 2 链的合成: 在第 1 链反应体系中加入 1.6 U Rnase H, 使cDNA和mRNA杂合体上的mRNA 链产生缺口, 再加入 50 U DNA聚合酶 和甲基化的dNTP, 合成cDNA 第 2 链。12 000 r/min离心 15 min沉淀双链DNA, 吹干后溶于 20 μL ddH<sub>2</sub>O中, 加入 1.5 U T4 DNA 聚合酶, 利用T4 DNA聚合酶补平双链cDNA 的末端。

#### 1.2.4 cDNA 与 *EcoR* /*Hind* 接头的连接及接头的消化

取末端补平的双链 cDNA 10 μL, 加入 2 μL

*EcoR* /*Hind* 接头在 T4 DNA 连接酶作用下在 cDNA 末端连接上定向 *EcoR* /*Hind* 接头。然后分别加入 *EcoR* 和 *Hind* 各 100 U 消化接头, 得到两端分别带有 *EcoR* 和 *Hind* 粘性末端的双链 cDNA。

1.2.5 cDNA 片段的分离

将上述消化产物全部上样于 Mini Column, 按 Mini Column Fractionation Kit 说明书对 cDNA 片段进行分离, 除去已消化的接头碎片和小片段的双链 cDNA 以及大于 3 kb 的不易与噬菌体包装的大片段, 收集 300 bp 以上 3 kb 以下的双链 cDNA。

1.2.6 cDNA 的重组与体外包装

上述分离的双链 cDNA 定量后与 T7 Select 10-3b Vector Arms 按照摩尔浓度比 3 : 1、1 : 1、1 : 3 的比例作 3 个不同的连接体系如表 1。T7 Select 10-3b Vector Arms 为两端分别带有 *EcoR* 和 *Hind* 切割位点的噬菌体 DNA, 可与经 *EcoR* 和 *Hind* 消化的双链 cDNA 两端互补, 在 T4 DNA 连接酶作用下, 16 ℃ 连接过夜, 形成重组 T7 Select 10-3b 载体。取连接产物 1 μL 与 5 μL 包装蛋白( T7 select packaging extract ) 混合, 22 ℃ 包装 2 h, 得到具有感染性的 T7 噬菌体颗粒。然后再选取滴度最高的比例做 5 μL 的连接体系, 取连接产物 5 μL 与 25 μL 包装蛋白混合, 22 ℃ 包装 2 h, 得到大量具有感染性的 T7 噬菌体颗粒。

表 1 不同比例 cDNA: vector arms 的连接体系  
Table 1 Ligase reaction of the different ratio of insert cDNA : vector arms

组分 Component	编号 No.		
	1	2	3
cDNA 与载体的浓度比 Ratio of insert cDNA: vector arms	3 : 1	1 : 1	1 : 3
Insert cDNA(μL)	0.45	0.15	0.05
T7 select vector arms(μL)	0.20	0.20	0.20
10×ligase buffer(μL)	0.10	0.10	0.10
10 mmol/L ATP(μL)	0.10	0.10	0.10
100 mmol/L dTT(μL)	0.10	0.10	0.10
T4 DNA ligase(μL)	0.05	0.05	0.05
ddH <sub>2</sub> O(μL)	0.00	0.30	0.40
总体积 Total volume(μL)	1.00	1.00	1.00

1.2.7 T7 噬菌体展示文库的鉴定

1.2.7.1 文库容量测定

将宿主菌 BL T5403 接种于 M9 TB 培养液, 37 ℃ 180 r/min 培养至 OD 值为 1。取包装产物 5 μL 用 TB 培养液做 10 倍梯度稀释, 每个梯度取

100 μL, 加入 250 μL OD 值为 1 的 BL T5403 菌液以及 1 mL Top 固体培养基, 混合均匀, 铺于 LB 平板上。37 ℃ 倒置培养 3~4 h 后, 计数各平板上噬菌斑数目, 计算文库的容量。滴度计算公式如下: 滴度 = 噬菌体数目 × 稀释倍数 × 10 pfu/mL。

1.2.7.2 文库重组率测定

从原始包装物滴度测定平板上挑取 100 个噬菌斑, 分别加入含有试剂盒中提供的 T7up 和 T7down 引物进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 50 s, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小, 并计算文库重组率。

1.2.7.3 文库的扩增

将全部包装产物与 BL T5403 菌液混合, 按 5 × 10<sup>4</sup> 个噬菌斑/板, 铺 15 cm LB 平板, 37 ℃ 倒置培养 3~4 h。待平板上噬菌斑长到直径为 1~2 mm 时, 每块板加 10 mL 噬菌体提取缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 6 mmol/L MgSO<sub>4</sub>) 覆盖平板, 4 ℃ 存贮过夜。次日收集噬菌体提取缓冲液, 加 0.15 mL 氯仿, 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上清。取 10 μL 上清进行 10 倍的梯度稀释, 铺板, 测定扩增后噬菌体展示文库的滴度。在扩增产物中加入 1/10 体积 80% 的灭菌甘油, 分装后 -70 ℃ 保存。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

用 Trizol 试剂提取花药总 RNA, 经紫外分光光度法测定, 产量为 550 μg, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> = 2.023, 说明 RNA 的纯度较高, 电泳结果如图 1 所示, 28S 和 18S rRNA 条带均清晰, 说明提取的总 RNA 质量很好, 未发生降解。

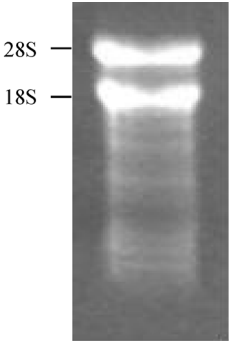


图 1 红莲杂种 F<sub>1</sub> 花药总 RNA 电泳  
Fig. 1 Total RNA extracted from the anther of Honglian F<sub>1</sub> hybrid rice

## 2.2 mRNA 分离

分离纯化的mRNA见图2, 产量为 6.5  $\mu\text{g}$ , 收率为 1.18%,  $OD_{260}/OD_{280} = 1.96$ , 并且电泳图上弥散的 mRNA 清晰可见, 分布均匀, 且看不到对应的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带无 rRNA 的污染, 表明分离的 mRNA 纯度高, 质量好可以用于 cDNA 合成。

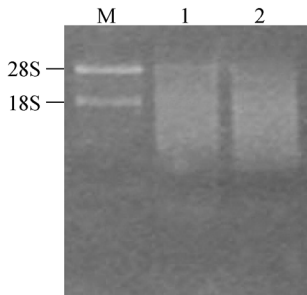


图2 mRNA 电泳图谱

M: 总 RNA; 1、2: 纯化后的 mRNA。

Fig. 2 The result of mRNA electrophoresis

M: Total RNA; 1, 2: mRNA isolated from the total RNA.

## 2.3 不同连接体系滴度的测定

双链 cDNA 与 T7 Select 10-3b vector arms 按照物质的量比 3:1、1:1、1:3 的比例作 3 个不同的连接体系, 与包装蛋白包装后, 结果如表 2, 3:1 的比例所得到的噬菌体文库滴度较高为  $5.72 \times 10^4$  pfu/mL, 故选取 insert: vector arms 为 3:1 的比例做 5  $\mu\text{L}$  的连接体系。

表 2 不同比例 cDNA: vector arms 的连接体系滴度

Table 2 The titer of different ratio of cDNA: vector arms

	编号 No.		
	1	2	3
cDNA 与载体摩尔浓度比	3:1	1:1	1:3
Ratio of insert cDNA: vector arms			
滴度 Titer (pfu/mL)	$5.72 \times 10^4$	$2.03 \times 10^3$	$1.03 \times 10^3$

## 2.4 T7 噬菌体展示文库的鉴定

红莲杂交水稻  $F_1$  花药未扩增文库的库容量为  $1.03 \times 10^6$  pfu/mL。对随机挑取的 100 个噬菌斑进行 PCR 鉴定(图 3), 文库重组率为 100%, 97% 的插入片段大于 300 bp, 测序结果显示无任何 rRNA 以及基因组 DNA 的污染, 符合文库构建要求。扩增后文库滴度为  $2.14 \times 10^{12}$  pfu/mL, 在扩增后的文库中随机挑取 100 个克隆进行 PCR, 仍然具有很好的多态性。

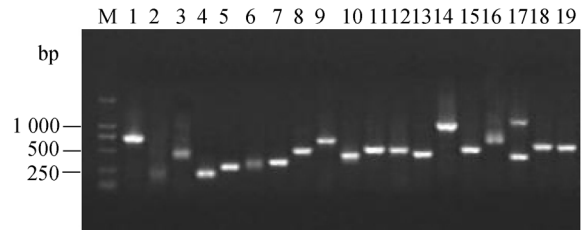


图3 随机挑取克隆的 PCR 检测

Fig. 3 PCR assay of clones picked at random from the T7 phage display library

## 3 讨论

噬菌体展示文库对于研究与生物大分子相互作用的小肽或蛋白有着广泛的应用, 它实现了基因型和表型的结合, 提供了高效率的筛选系统, 其技术要点是将外源基因插入改建过的噬菌体外壳蛋白基因以表达外源短肽。对于构建高质量的文库噬菌体展示文库而言, 其关键是要保证文库的滴度和重组率。一般 cDNA 文库构建的关键在于获得高质量的 mRNA, RNA 易被 RNA 酶降解, 而 RNA 酶广泛存在, 且不容易失活, 所以建立一个无 RNA 酶的环境对于制备优质的 RNA 非常重要, 尤其是对于花药这样的材料。因此, 本实验的操作一般都在冰上进行, 并且在尽可能短的时间内完成, 确保 RNA 的质量。最后我们通过几个不同的小的连接体系寻找到了双链 cDNA 与噬菌体载体二者之间连接的最佳比例, 从而有效地提高了重组率和滴度, 使本实验构建的噬菌体展示文库滴度达到  $1.03 \times 10^6$  pfu/mL, 重组率为 100%, 为以后的高效筛选提供了基础。

目前, 红莲型杂交稻在生产上得到了大面积推广, 但是对于红莲型不育和育性恢复分子机理研究还是不够清楚<sup>[18,19]</sup>, 基础研究明显滞后于生产应用。因此, 需要加强对红莲型不育和育性恢复分子机理的进一步研究。噬菌体展示文库的构建为今后的基础研究提供了适用的技术支持。与其他技术相比, 噬菌体展示技术的主要优点是容易对库容量较大的文库进行筛选, 标准的 cDNA 文库筛选受噬菌斑数目或能通过杂交筛选的克隆数目的限制, 通常只能达到  $10^4$  数量级。而用噬菌体展示技术, 可以很容易地对多样性大于  $10^9$  的文库进行筛选。同时由于筛选出的噬菌体还可以在大肠杆菌中进行再扩增, 从而可以进行连续多轮的筛选, 得到高亲和力的噬菌体, 并且获得其核酸序列相对比较容易。本研究应用的是一种新的噬菌体展示技术 T7 噬菌体展示系统, 与其他噬菌体相比, T7 噬菌体复制

周期短, 细胞质蛋白组装操作和储存方便, 克隆效率高, 更适用于高效文库构建和亲和淘洗。并且 T7 噬菌体展示系统能构建和筛查更大的文库, 能使我们在对不育及育性恢复分子机理知之甚少的情況下, 开展广泛而有效的筛选, 通过“点面结合”寻找与育性相关的分子, 形成分子间相互作用的网络信号通路, 深化我们对于雄性不育的系统认识。

## 参考文献(References):

- [1] Laser KD, Lersten NR. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot Rev*, 1972, 38: 425–454. [\[DOI\]](#)
- [2] Mackenzie S, Shichuan H, Lyznik A. The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol*, 1994, 105: 775–780.
- [3] Schnable PS, Wise RP. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science*, 1998, 3: 175–180. [\[DOI\]](#)
- [4] ZHU Ying-Guo, LI Rong-Qian, WANG Ming-Quan. Biology of Rice Male Sterility. Wuhan: Wuhan University Press, 2000, 100–123.  
朱英国, 利容千, 王明全. 水稻雄性不育生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 2000, 100–123.
- [5] Wang ZH, Zou YJ, Li XY, Zhang QY, Chen LT, Wu H, Su DH, Chen YL, Guo JX, Luo D, Long YM, Zhong Y, Liu YG. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell*, 2006, 18(3): 676–687. [\[DOI\]](#)
- [6] Iwabuchi M, Kyoizuka J, Shimamoto KO. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J*, 1993, 12: 1437–1446.
- [7] Kadowaki K, Suzuki T, Kazama SA. Chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. *Mol Gen Genet*, 1990, 224: 10–16. [\[DOI\]](#)
- [8] YI Ping, WANG Li, SUN Qing-Ping, ZHU Ying-Guo. Identification of mitochondrially chimeric gene associated with Honglian type of cytoplasmic male sterility of rice. *Sci Bull*, 2002, 47(2): 130–133.  
易平, 汪莉, 孙清萍, 朱英国. 红莲型细胞质雄性不育系线粒体相关嵌合基因的发现. 科学通报, 2002, 47(2): 130–133.
- [9] KONG Jin, TAN Yan-Ping, CHEN Zu-Yu, LI Shao-Qing, ZHU Ying-Guo. Study on the editing sites in transcripts of functional genes of HL cytoplasmic male sterility rice mitochondria during microgametogenesis. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2006, 24(2): 95–99.  
孔进, 谭艳平, 陈祖玉, 李绍清, 朱英国. 水稻红莲型不育系雄性配子发育过程中线粒体功能基因转录本的编辑位点研究. 武汉植物学研究, 2006, 24(2): 95–99.
- [10] LI Xiao-Ming, ZHENG Yong-Lian, ZHANG Fang-Dong, ZHU Ying-Guo. RFLP analysis of mitochondria DNA from HL type cytoplasmic male sterility rice. *Hereditas (Beijing)*, 2000, 22(4): 201–204.  
李小明, 郑用琰, 张方东, 朱英国. 红莲细胞质雄性不育水稻线粒体DNA的RFLP分析. 遗传, 2000, 22(4): 201–204.
- [11] WANG Chang-Jun. Advance of phage surface display-technology. *Foreign Medicine (immunology)*, 2001, 24(4): 215–218.  
王长军. 噬菌体表面展示技术进展. 国外医学免疫学分册, 2001, 24(4): 215–218.
- [12] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228: 1315–1317. [\[DOI\]](#)
- [13] Hansen MH, Ostenstad B, Sioud M. Identification of immunogenic antigens using a phage-displayed cDNA library from an invasive ductal breast carcinoma tumour. *Int J Oncol*, 2001, 19(6): 1303–1309.
- [14] Kataoka K, Yoshitomo-Nakagawa K, Shioda S, Nishizawa M. A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities (isolated proteins interacting a DNA-binding domain). *J Biol Chem*, 2001, 276: 819–826. [\[DOI\]](#)
- [15] Wang D, Parrish CR. A heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-related protein Binds to single-stranded DNA near the 5' end or within the genome of feline parvovirus and can modify virus replication. *J Virol*, 1999, 73(9): 7761–7768.
- [16] Alex VS, Marissa P, James JL, Bryan F. The interactions of peptides with the innate immune system studied with use of T7 phage peptide display. *Mol Ther*, 2000, 2: 131–139. [\[DOI\]](#)
- [17] Danner S, Belasco JG. T7 phage display: A novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, 98(23): 12954–12959. [\[DOI\]](#)
- [18] WEN Li, LIU Gai, ZHANG Zai-Jun, TAO Jun, WAN Cui-Xiang, LI Shao-Qing, ZHU Ying-Guo. Preliminary proteomics analysis of the total proteins of HL type cytoplasmic male sterility rice anther. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28(3): 311–316.  
文李, 刘盖, 张再君, 陶钧, 万翠香, 李绍清, 朱英国. 红莲型水稻细胞质雄性不育花药蛋白质组学初步分析. 遗传, 2006, 28(3): 311–316.
- [19] Li SQ, Wan CX, Kong J, Zhang ZJ, Li YS, Zhu YG. Programmed cell death during mirogensis in Honglian CMS line of rice correlated with oxidative stress in mitochondria. *Funct Plant Biol*, 2004, 31: 369–376. [\[DOI\]](#)