

红麻雄性不育细胞质相关的 cSNP 位点发掘

赵艳红^{1,2} 廖小芳² 李初英^{1*} 赵洪涛¹ 黄其椿¹ 余明丽² 周瑞阳^{2*}

(1. 广西农业科学院 经济作物研究所, 南宁 530007;

2. 广西大学 农学院, 南宁 530005)

摘要 在前期已获得红麻 *atp9* 基因编码区的基础上,以红麻细胞质雄性不育系 P3A、保持系和 F₁ 代为材料,随机选取不同材料的 3 个 *atp9* 独立 gDNA 克隆子进行测序和序列比对。结果显示:具有不育细胞质的不育系和 F₁ 代与具有可育细胞质的保持系在第 290 位点处存在碱基差异,具有不育细胞质的材料均为碱基 T,而具有可育细胞质的材料在相应位点为碱基 A;*atp9* 基因第 290 位点处 T/A 碱基转换的 cSNP 位点经已知细胞质的红麻种质资源的进一步检测,同时结合这些资源的田间育性进行分析发现,红麻种质资源 UG93-2MS-1、UG93-2MS-2、UG93-2MS-3、UG93-2-22、KN250、KN142、ZB90 在第 290 位点处为碱基 T,能扩增出 319 bp 条带,在田间对应的育性除品种 UG93-2-22 为可育外,其余均为不育或半不育;而福红 992 在第 290 位点处为碱基 A,未能扩增出 319 bp 条带,在田间对应的育性为可育。因此,位于 *atp9* 基因的第 290 位点处的 T/A 碱基转换的 cSNP 位点与红麻不育细胞质相关或连锁,为红麻不育细胞质鉴定提供了新的检测手段。

关键词 红麻;分子标记;不育细胞质;cSNP

中图分类号 S 563.5

文章编号 1007-4333(2016)05-0051-06

文献标志码 A

Development of the molecular marker cSNP associated with male sterile cytoplasm in kenaf

ZHAO Yan-hong^{1,2}, LIAO Xiao-fang², LI Chu-ying^{1*}, ZHAO Hong-tao¹,
HUANG Qi-chun¹, YU Ming-li², ZHOU Rui-yang^{2*}

(1. Cash Crop Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract Based on the coding sequences of *atp9* obtained in our previous study, three random and separate *atp9* gDNA clones of the CMS (Cytoplasmic male sterility) line P3A, its maintainer P3B and F₁ progeny were sequenced and their *atp9* sequence alignment were analyzed in kenaf. The results showed that there existed a base differentiation located on 290 th of *atp9* between male sterile cytoplasm and male fertile cytoplasm in kenaf. The cytoplasmic male sterility line and F₁ progeny containing the male sterile cytoplasm have base T, however the maintainer line containing male fertile cytoplasm has base A. Some germplasm resources containing known cytoplasm were further analyzed combined with sterility analyses using sequencing and PCR amplification based on the molecular marker cSNP (T/A transformation) located on 290 th of *atp9*. The results showed that the varieties of UG93-2MS-1, UG93-2MS-2, UG93-2MS-3, UG93-2-22, KN250, KN142, ZB90 have base T and could be amplified 319 bp fragment, and the fertility are sterility or semi-sterility except the variety of UG93-2-22, the variety of Fuhong 992 containing male fertile cytoplasm has base A and had no amplified products. These results suggested that the cSNP (T/A transformation) located on 290 th of

收稿日期: 2015-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460366); 广西农业科学院科技发展基金重点项目(2015JZ09, 2015JZ19); 国家麻类产业技术体系建设专项资金资助(CARS-19-S14); 广西农业科学院基本科研业务费团队项目(2015YT65)

第一作者: 赵艳红, 副研究员, 博士, E-mail: zhaohong8011@126.com

通讯作者: 李初英, 研究员, 主要从事麻类作物育种与栽培研究, E-mail: lcy6689@126.com;

周瑞阳, 教授, 主要从事红麻育种与栽培研究, E-mail: ruiyangzhou@aliyun.com

atp9 was associated with male sterile cytoplasm or linked to male sterile cytoplasm. It can be developed into new molecular marker to identify sterile cytoplasm.

Keywords kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.); molecular marker; sterile cytoplasm; cSNP

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 是锦葵科 (Malvaceae) 木槿属 (*Hibiscus*) 一年生草本韧皮纤维作物, 以收获茎秆或韧皮纤维为栽培目的。杂种优势的利用极大的提高了红麻的茎秆和韧皮纤维产量, 其杂种优势率高达 35%~40%^[1]。目前, 红麻发现了“营养亏缺型雄性不育”^[2]、质核互作型雄性不育株^[3]、红麻雄性两用不育系^[4]等不同雄性不育类型。这些不育特性通过回交转育的方法育成了一系列的不育系^[5-6], 这些不育细胞质的来源不同, 周瑞阳等报道的细胞质不育突变体来源于非洲乌干达的 UG93 品种^[5], 李德芳育种课题组报道的细胞质不育突变体来源于澳大利亚引进的红麻品种 ATA 的组合材料后代^[3]。长期以来, 红麻杂种优势利用是国内外红麻育种的主攻目标, 而杂种优势的利用有赖于红麻不育细胞质的发掘。为了选育新的雄性不育细胞质, 一般以现有种质资源做母本与现有的保持系杂交, 然后选择不育后代与该保持系进行 3~5 次回交, 利用此方法筛选不育细胞质, 不但工作量大, 而且带有很大盲目性^[7]。若能找到一种快速准确鉴别红麻雄性不育细胞质的方法, 对现有种质资源进行鉴定, 以发掘出更多的具有雄性不育细胞质资源, 继而选育出新的雄性不育系。周瑞阳等^[5]报道的红麻 CMS (Cytoplasmic male sterility) 系均为野败型 UG93 细胞质, 在生产上大面积推广来源于单一细胞质的杂交种存在较大风险, 极可能成为某一病害生理小种的哺育品种, 引起这一病害大流行。因此, 开发出能准确区别 UG93 野败型不育细胞质方法具有重要意义。

SNP (Single nucleotide polymorphism, 单核苷酸多态性), 是因单个核苷酸碱基的改变而导致的核酸序列的多态性。在不同个体的同一条染色体或同一位点的核苷酸序列中, 绝大多数核苷酸序列一致而只有一个碱基不同, 将分布在基因编码区的 SNP 称为 cSNP, 有时会引起功能性突变^[8]。目前, 利用 SNP 技术发掘与植物雄性不育或不育细胞质相关或连锁的分子标签得到广泛运用^[9-10]。本实验室开发了一个与红麻不育细胞质相关的 MM556 分子标签, 该序列位于线粒体基因 *atp9* 的 3' 端^[11]; 牛英等^[12]采用 SRAP 分子标记技术, 筛选到一个能特异

性标记红麻细胞质雄性不育胞质的分子标签—Me14/Em8; 金刚等^[13]在牛英筛选的 SRAP 分子标签的基础上开发了一个能特异鉴定红麻野败型不育胞质的 SNP 分子标签; 同时, 李辉等^[14]采用 ISSR 分子标记方法, 在红麻不育池中筛选出与雄性不育基因连锁的长 700 bp 的 ISSR 分子标签 U859₇₀₀。本实验室克隆了一对不育系/保持系的 *atp9* 基因编码区且获知该编码区存在 4 个 cSNP 位点, 但红麻不同材料间 *atp9* 编码区是否存在相同的 cSNP 位点, 这些 cSNP 位点是否与红麻不育性相关尚未清楚^[15], 而且利用线粒体 *atp9* 基因编码区的 cSNP 位点鉴定红麻不育胞质的方法未见相关报道。本研究旨在发掘一种快速准确鉴别红麻雄性不育胞质的方法, 不仅为红麻分子辅助育种提供检测手段, 而且有利于保护现有雄性不育系及其杂交种的知识产权。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

红麻细胞质雄性不育系 P3A, P3B 和 F₁ 代 (P3A/恢复系 992) 被用于 cSNP 位点发掘, 选择已知细胞质的 2 类材料进行 cSNP 分子标记稳定性和准确性验证: 1) 已知不育细胞质材料: 红麻细胞质雄性不育系 P3A, K03A, 722A, L23A, 917A, F3A; 杂交种 F₁ (P3A/992), F₂ (P3A/992), F₁、F₂ 代的细胞质在理论上与亲本不育系具有相同的雄性不育细胞质; 2) 已知可育细胞质材料: 保持系 P3B, K03B, 722B, L23B, 917B, F3B; 恢复系福红 992^[16]。对已知细胞质育性的红麻品种资源 UG93-2MS-1、UG93-2MS-2、UG93-2MS-3、UG93-2-22、KN250、KN142 和 ZB90 的细胞质进行检测, 结果表明: UG93-2MS-1、UG93-2MS-2 和 UG93-2MS-3 均为红麻野败型 UG93 雄性不育突变体的衍生株系, UG93-2-22 是从 UG93 野生型品种筛选出的可育株系, KN142, ZB90 和 KN250 是来自非洲的品种资源^[15]。

1.2 试验方法

1.2.1 基于测序技术发掘和验证 cSNP 位点

利用前期克隆红麻线粒体 *atp9* 基因编码区的特异引物 *atp9* QF: ATGAATGATAAAGCGC-GTGACGAGA 和 *atp9* QR: TCAGCACGGTGCA-

GTCTCCACTTTA,以 P3A、P3B 和 F₁ 代的 gDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增的 20 μL 反应体系包括 20~50 ng/μl 的 gDNA 模板,2 μL 的 10×B_uffer, 0.6 μmol/L 的上、下游引物,用水补足 20 μL。该反应混合物首先 95 °C 预变性 3 min,然后 94 °C 20 s,63 °C 20 s,72 °C 20 s,扩增 35 个循环,最后 72 °C 终延伸 3 min,PCR 反应产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物进行回收纯化后,进行 T-A 克隆,随机挑选 3 个独立克隆的克隆子进行测序,采用 DNAMAN 软件进行序列比对,找出不育细胞质特异的 cSNP 位点。同样方法对已知和未知细胞质育性的供试材料进行 cSNP 位点验证。

1.2.2 基于 PCR 扩增检测 cSNP 位点

基于上述测序的结果,利用不育细胞质特异 cSNP 位点设计了下 游引物 SNPAR (CTTT-ATTATGTGAAAGAGGTGCTTGCTTTA),该引物的 3'端的第一个碱基为 cSNP 碱基。该下游引物与 *atp9* 编码区的上游引物 *atp9*QF (ATGAA-

TGATAAAGCGCGTGACGAGA) 组配成 *atp9*QF/SNPAR 引物对,以上述材料的 gDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系和程序同上,退火温度根据各自的引物对选择最佳退火温度。

2 结果与分析

2.1 红麻不育细胞质 cSNP 分子标记发掘

采用测序的方法对红麻细胞质雄性不育系 P3A、保持系 P3B 和 F₁(P3A/992)代的随机 3 个独立 *atp9* 克隆子进行测序,利用 DNAMAN 软件进行序列比对。结果显示,具有不育细胞质的不育系和 F₁ 代与具有可育细胞质的保持系材料在第 290 位点处存在碱基差异,其中具有不育细胞质的材料均为碱基 T,而具有可育细胞质的材料在相应位点为碱基 A。因此,基于 *atp9* 基因编码区的第 290 位点处存在一个 T/A 碱基转换的 cSNP 位点(图 1)。该位点的碱基转换导致了氨基酸不同,其中不育系和 F₁ 代为异亮氨酸(ATA),保持系为赖氨酸(AAA)。

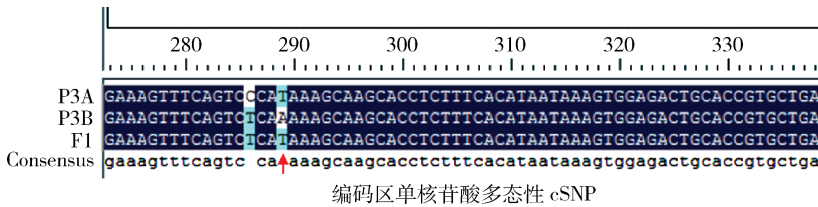


图 1 红麻 CMS 系 P3A、保持系 P3B 和 F₁ 代的 *atp9* 基因 CDS 序列部分比对图
Fig. 1 Alignment of partial CDS of *atp9* from P3A, P3B and F₁ progeny in kenaf

2.2 红麻不育细胞质 cSNP 分子标记稳定性和重复性检测

为了进一步验证红麻不育细胞质 cSNP 分子标记稳定性和重复性,选用 5 对已知细胞质育性的不育系和保持系 K03A/K03B、722A/722B、L23A/

L23B、917A/917B、F3A/F3B 进行了 cSNP 分子标记检测。结果显示:所有含不育细胞质的不育系在第 290 位点为碱基 T,而具有可育细胞质的保持系在相应位点处为碱基 A(图 2),与图 1 所标位置完全一致。说明该 cSNP 位点可用于红麻不育细胞质

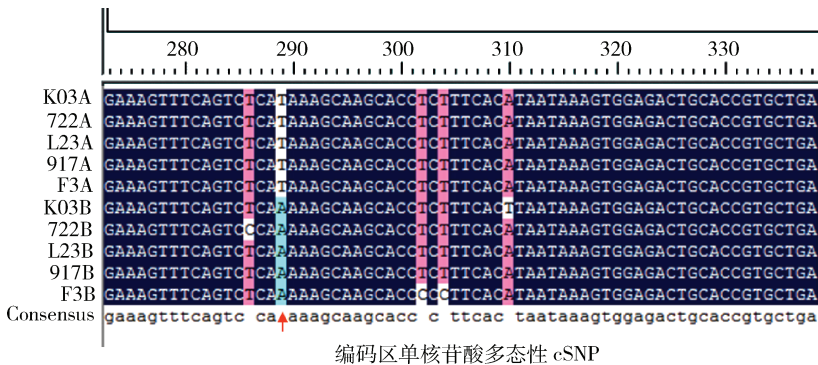


图 2 已知红麻细胞质育性材料的 *atp9* 基因 CDS 序列部分比对图

Fig. 2 Alignment of partial CDS of *atp9* from some germplasm resources containing known cytoplasm in kenaf

和可育细胞质的鉴别。

2.3 红麻不育细胞质 cSNP 分子标记在鉴定红麻细胞质种质资源中的运用

利用在已知细胞质育性材料中表现稳定的不育细胞质 cSNP 分子标签,对本实验室前期利用分子标签 MM556 鉴定为不育和可育细胞质的红麻资源品种^[15]进行了检测。结果显示:红麻种质资源 UG93-2MS-1, UG93-2MS-2, UG93-2MS-3, UG93-2-22, KN250 在第 290 位点为碱基 T,与不育细胞质 cSNP 位点一致;品种福红 992 在第 290 位点为碱基 A,与可育细胞质 cSNP 位点一致,这些检测结果与分子标签 MM556 检测结果一致(图 3)。这些品种资源虽然监测到在第 290 位点具有碱基 T 或 A,但其细胞质育性尚不清楚。为了进一步证实上述资

源细胞质育性问题,以上述检测为不育细胞质资源为母本,现有保持系为父本,已成功选育出了新的雄性不育系,表明母本携带的细胞质为不育细胞质^[17-19]。品种福红 992 在红麻杂交育种组配中是属于恢复系,因此该品种的细胞质为可育细胞质。上述材料经田间育性观察,结果显示:具有不育细胞质 cSNP 位点的种质资源 UG93-2MS-1, UG93-2MS-2, UG93-2MS-3, KN250 的育性为不育或半不育,具可育细胞质的恢复系福红 992 的育性表现为可育^[16]。UG93-2-22 是来源于 UG93 野生型品种的一个株系表现出特殊性,具有不育细胞质 cSNP 位点但又表现为可育。因此,进一步证明由 cSNP 分子标记检测出的不育细胞质具有正确性和可靠性。

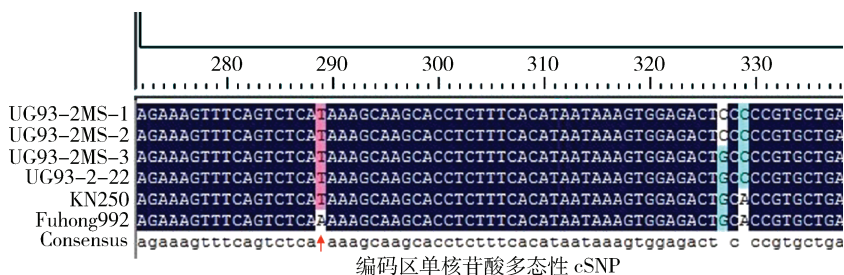


图 3 未知细胞质育性的红麻品种资源 *atp9* 基因 CDS 序列部分比对图

Fig. 3 Alignment of partial CDS of *atp9* from some germplasm resources containing unknown cytoplasm in kenaf

2.4 基于 PCR 方法对红麻不育细胞质 cSNP 位点的验证

基于不育细胞质资源在第 290 位点的特异碱基 T,设计特异引物 *atp9*QF/SNPAR 对上述材料进行 PCR 扩增检测。结果显示,具不育细胞质的不育系 (P3A、917A、722A、L23A、K03A)、F₁ (P3A/992)、F₂ (P3A/992) 代、红麻品种资源 UG93-2MS-1、UG93-2MS-2、UG93-2MS-3、UG93-2-22、KN250、

KN250-1、KN142、ZB90 等材料都扩增出 319 bp 的条带;而具有可育细胞质的保持系、恢复系未扩增出相应的条带(图 4)。引物 SNPAR 的 3'端第一个碱基为不育细胞质特异的碱基 T,因此具不育细胞质的材料可以扩增出条带而可育细胞质无条带,“有/无”条带的规律与不育细胞质/可育细胞质相匹配,说明利用单碱基差异设计特异引物进行 PCR 扩增检测 cSNP 位点是行之有效的方法。



泳道 1~21 分别为: P3A、P3B、917A、917B、722A、722B、L23A、L23B、K03A、K03B、F₁ (P3A/992)、F₂ (P3A/992)、992、UG93-2ms-1、UG93-2ms-2、UG93-2ms-3、UG93-2-22、KN250、KN250-1、KN142、ZB90; M: DL2 000 DNA marker

图 4 部分红麻种质资源 cSNP 位点 PCR 扩增图

Fig. 4 The cSNP loci of partial germplasm resources were identified based on PCR amplification in kenaf

3 讨论

3.1 红麻不育细胞质 cSNP 位点与红麻 CMS 的关系

基于 *atp9* 基因 CDS 区开发的红麻不育细胞质 cSNP 分子标签,实质上是与红麻野败型 UG93 不育细胞质相关或连锁的分子标签,具有不育细胞质的品种不一定就表现为雄性不育,但两者存在一定的关联。例如,与红麻 CMS 系杂交的后代具有不育细胞质其育性为可育,因细胞质遗传属于母性遗传,此现象就不难理解了。红麻品种资源 UG93-2-22 是从 UG93 野生型品种中筛选出来的一个株系^[5],该株系具有 UG93 野败型突变体的不育细胞质,但在田间的育性表现可育。该株系经检测具有不育细胞质 cSNP 位点但又表现为可育,具有特殊性。红麻品种资源 UG93-2-22 表现出拥有不育细胞质且可育的特殊品质,可能源于 UG93-2-22 具有恢复基因,利用该材料与红麻已知的细胞质雄性不育系(细胞质来源于野败型 UG93 不育细胞质)进行杂交,获得的 F₁ 代群体,在某种意义上说是具有恢复基因或缺失恢复基因的近等基因系,是研究红麻恢复基因的宝贵材料。

本研究发现的 cSNP 位点位于红麻线粒体能量代谢基因 *atp9* 基因的编码区,属于功能区域,有可能是导致不育的关键遗传位点。目前已开发出多种形式的红麻不育细胞质分子标签,例如:利用非编码区的碱基缺失开发的不育细胞质分子标签 MM556^[11,15] 和 HM138^[20] 能特异的检测出红麻不育细胞质;利用 SRAP 分子标记技术,筛选到 1 个能特异性标记红麻细胞质雄性不育胞质的分子标签—Me14/Em8^[12],该分子标签经进一步验证实质为 G/A 碱基差异的 SNP 位点^[13]。上述分子标签在现有的不育系、保持系、恢复系、杂交后代以及部分红麻种质资源上验证,结果显示这些标记与红麻不育细胞质相关,其中红麻不育细胞质分子标签 MM556(含 *atp9* 基因的完整编码区)经与线粒体信号肽以及 GFP 荧光蛋白构建融合基因转化烟草,转基因 T₀ 代出现了不育表型^[21]。验证结果表明了 MM556 这个区域与红麻 CMS 的相关性,因该区域包含了 *atp9* 基因的完整编码区和 *atp9* 基因 CDS 下游 3' 端缺失 47 个碱基的区域,红麻 CMS 的发生是由这两个区域中的其中 1 个引起还是 2 个区域联合导致尚未清楚。本研究中的红麻不育细胞质相关或连锁的 cSNP 位点位于 *atp9* 基因的编码区,Zhao

等^[21]报道的融合基因也包含了该 cSNP 位点,该位点的碱基差异导致了氨基酸的不同。*atp9* 基因的 CDS 区在转录水平差异细微,不育系为保持系的 0.937 倍^[15],因此该 cSNP 位点的变异可能直接影响蛋白质结构,或是该 cSNP 位点与 *atp9* 的 3' 端缺失碱基区域存在相互作用或独立作用导致 CMS 的发生,其原因有待进一步验证。

3.2 cSNP 分子标记检测方法探讨

本研究通过 cSNP 分子标记检测共获得含不育细胞质的材料 P3A,917A,722A,L23A,K03A,F₁(P3A/992),F₂(P3A/992),UG93-2MS-1,UG93-2MS-2,UG93-2MS-3,UG93-2-22,KN250,KN250-1,KN142,ZB90。这 15 份材料与分子标签 MM556^[11,15] 和分子标签 HM138^[20] 检测的结果一致。说明采用测序和 PCR 扩增方法对 SNP 位点进行检测是行之有效的方法。测序方法准确、可靠,但检测费用高,周期长;PCR 检测快速,成本低,但存在假阳性的可能性。因此,针对不同实验目的可以选择不同方法,如果是大量资源的筛选可以先采用 PCR 扩增方法进行初筛,然后再采用测序的方法进行进一步的验证。

参 考 文 献

- [1] 祁建民,陈幼玉,周瑞阳,林荔辉,梁康迳,吴建梅,方平平.红麻产量和纤维品质性状的遗传效应与杂种优势分析[J].作物学报,2005,31(4):469-475
Qi J M, Chen Y Y, Zhou R Y, Lin L H, Liang K J, Wu J M, Fang P P. Genetic effects and heterosis analysis for yield and quality traits in Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(4): 469-475 (in Chinese)
- [2] 周瑞阳.红麻雄性不育株的发现[J].中国农业科学,2002,35(2):212
Zhou R Y. Discovery of male sterile plants in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L) [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(2): 212 (in Chinese)
- [3] 陈安国.红麻雄性不育株的发现及其初步研究[J].中国麻业,2003,25(2):61
Chen A G. Discovery and study of male sterile plants in kenaf [J]. *China's Fiber Crops*, 2003, 25(2): 61 (in Chinese)
- [4] 李德芳,陈安国,李辉,唐慧娟,李建军,黄思齐.红麻雄性两用不育系的发现和初步研究[J].中国麻业科学,2014,36(3):166
Li D F, Chen A G, Li H, Tang H J, Li J J, Huang S Q. Discovery and study of dual-purpose male sterile lines in kenaf [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2014, 36(3): 166 (in Chinese)

- [5] 周瑞阳,张新,张加强,甘正华,韦汉西.红麻细胞质雄性不育系的选育及杂种优势利用取得突破[J].中国农业科学,2008,41(1):314
Zhou R Y, Zhang X, Zhang J Q, Gan Z H, Wei H X. A breakthrough in kenaf cytoplasmic male sterile lines breeding and heterosis utilization [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(1):314 (in Chinese)
- [6] 李德芳,陈安国,唐慧娟.红麻质核互作型雄性不育系的发现及初步创制[J].中国麻业科学,2007,29(2):78
Li D F, Chen A G, Li H, Tang H J. Discovery and study of cytoplasmic male sterile lines in kenaf[J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2007, 29(2):78 (in Chinese)
- [7] 张天真.作物育种学总论[M].3版.北京:中国农业出版社,2012
Zhang T Z. *Pandect of Crop Breeding* [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2012 (in Chinese)
- [8] 李延思,周艳红. SNP 功能分析的生物学信息学方法及其资源[J].计算机仿真,2007,24(4):297-299
Li Y S, Zhou Y H. Bioinformatics methods and resources for SNP functional analysis [J]. *Computer Simulation*, 2007, 24(4):297-299 (in Chinese)
- [9] Lee J, Yoon J B, Han J H, Lee W P, Hoon K S, Park H G. Three AFLP markers tightly linked to the genic male sterility *ms3* gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L) and conversion to a CAPS marker[J]. *Euphytica*, 2010, 173:55-61
- [10] Yu X L, Xiao Q B, Cao J S, Chen Z J, Hirata Y. Development of two new molecular markers specific to cytoplasmic male sterility in tuber mustard (*Brassica juncea* var *tumida* Tsen et Lee)[J]. *Euphytica*, 2009, 166:367-378
- [11] Zhao Y H, Chen P, Liao X F, Zhou B J, Liao J, Huang Z P, Kong X J, Zhou R Y. A comparative study of *atp9* gene between CMS and its maintainer line and further development of a molecular marker distinctively to male sterile cytoplasm in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L)[J]. *Molecular breeding*, 2013, 32(4):969-976
- [12] 牛英.红麻雄性不育细胞质的分子标记及种质资源遗传多样性分析[D].南宁:广西大学,2008
Niu Y. Finger printing for cytoplasmic male sterility and analysing on genetic diversity in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L)[D]. Nanning: Guangxi University, 2008 (in Chinese)
- [13] 金刚,牛英,唐向民,周琼,周瑞阳.红麻野败型 CMS 胞质 SNP 分子标签的发掘[J].西北植物学报,2012,32(12):2412-2418
Jin G, Niu Y, Tang X M, Zhou Q, Zhou R Y. Discovery of an SNP marker associated with CMS cytoplasm in kenaf (*Hibiscus cannabinus*)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(12):2412-2418 (in Chinese)
- [14] 李辉,李德芳,陈安国,唐慧娟,李建军,霍光.红麻雄性不育系的选育和不育基因的 ISSR 分子标记[J].中国农学通报,2008,24(8):80-83
Li H, Li D F, Chen A G, Tang H J, Li J J, Huo G. The breeding of kenaf male sterility and ISSR maker of male sterile gene[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(8):80-83 (in Chinese)
- [15] 赵艳红,廖小芳,赵洪涛,黄其椿,唐兴富,李初英,周瑞阳.红麻线粒体基因 *atp9* 克隆及不育细胞质分子标签的利用[J].南方农业学报,2015,46(6):964-969
Zhao Y H, Liao X F, Zhao H T, Huang Q C, Tang X F, Li C Y, Zhou R Y. Cloning mitochondrial gene *atp9* and utilization molecular marker associated with male sterile cytoplasm in kenaf[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(6):964-969 (in Chinese)
- [16] 廖小芳,赵艳红,周瑞阳,陈鹏,周琼,周步进.基于红麻 *atp8* 基因鉴定雄性不育细胞质的方法.中国,ZL201310710995.6[P].2015-04-01
Liao X F, Zhao Y H, Zhou R Y, Chen P, Zhou Q, Zhou B J. A method of detecting male sterile cytoplasm based on *atp8* gene. China, ZL201310710995.6[P]. 2015-04-01 (in Chinese)
- [17] 赵艳红,廖小芳,周瑞阳,陈鹏,周琼,周步进.利用红麻 KN250 的不育细胞质选育雄性不育系的方法.中国,ZL201310714202.8 [P].2015-09-16
Zhao Y H, Liao X F, Zhou R Y, Chen P, Zhou Q, Zhou B J. A method of breeding male sterile lines based on the male sterile cytoplasm of KN250 variety. China, ZL201310714202.8 [P]. 2015-09-16 (in Chinese)
- [18] 廖小芳,赵艳红,周瑞阳,陈鹏,周琼,周步进.利用红麻 KN142 的不育细胞质选育雄性不育系的方法.中国,ZL201310711047.4 [P].2015-09-16
Liao X F, Zhao Y H, Zhou R Y, Chen P, Zhou Q, Zhou B J. A method of breeding male sterile lines based on the male sterile cytoplasm of KN142 variety. China, ZL201310711047.4 [P]. 2015-09-16 (in Chinese)
- [19] 陈鹏,周琼,周瑞阳,赵艳红,廖小芳,周步进,何冰.利用红麻 ZB90 的不育细胞质选育雄性不育系的方法.中国,ZL201310710624.8 [P].2015-09-16
Chen P, Zhou Q, Zhou R Y, Zhao Y H, Liao X F, Zhou B J, He B. A method of breeding male sterile lines based on the male sterile cytoplasm of ZB90 variety. China, ZL201310710624.8 [P]. 2015-09-16 (in Chinese)
- [20] Liao X F, Zhao Y H, Chen P, Zhou B J, Diao Y, Yu M L, Huang Z P, Zhou R Y. A comparative analysis of the *atp8* gene between a cytoplasmic male sterile line and its maintainer and further development of a molecular marker specific to male sterile cytoplasm in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L)[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015 (IOD:10.007/s11105-015-0984-6)
- [21] Zhao Y H, Liao X F, Huang Z P, Chen P, Zhou B J, Liu D M, Kong X J, Zhou R Y. Expression of kenaf mitochondrial chimeric genes *HMI84* causes male sterility in transgenic tobacco plants[J]. *Mitochondrial DNA*, 2015, 26(4):495-500