

배추 약 발달 시기별 유전자의 발현 양상

김현욱¹ · 정규환^{2*}

¹농업과학기술원 세포유전과, ²중앙대학교 원예과학과

Expressional Patterns of Anther-specific Genes from Chinese Cabbage during the Flower Development

Kim, Hyun Uk¹ · Chung, Kyu Hwan^{2*}

¹Cytogenetics Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

²Dept. of Horticultural Science, Chung-Ang University, Ansong, Kyonggido, 456-756, Korea

*corresponding author

ABSTRACT This study was carried out with the purpose of looking into the transcriptionally regulated genes related to the anther development, characterizing them, and applying their promoters to induce male-sterile plants and restore their fertility. Fifteen anther-specific clones were isolated from the anther cDNA library of Chinese cabbage through the differential screening and sequenced partially at both ends. These partial sequence data showed that cDNA clones BAN52, 84, 101, and 229 are very similar to polygalacturonase, ascorbate oxidase, H⁺-translocating ATPase, and pectin esterase genes respectively. However, the other clones have not been matched to any of gene sequences in data bank. In northern dot blot analysis, the transcripts of cDNA clone BAN5, 10, 33, 52, 57, 102, 103, 215, 229 appeared in the flower bud of 2.1 mm in length and their amounts were gradually increased along with the anther development. Transcription of cDNA clone BAN32, 54, 62, 84, 101 began in flower bud of 3.9 mm, which is the late stage in anther development. However, the transcription of BAN87 was very small, but its transcript was detected in all anther developmental stages.

Additional key words: anther, cDNA, male sterile, tapetum, tetrads, transcription

서 언

수술은 형태적으로 화사와 약으로 구분되는 데, 화사는 약을 지지해 주면서 수분과 영양분의 공급 통로 역할을 하는 유관속 조직이며, 약은 비생식 조직과 생식 조직으로 이루어져 있으며 화분을 생성, 방출하는 역할을 한다. 약과 화사의 구분은 수술 시원체 형성 직후에 시작되는데, 약은 수직 평면으로 대칭되는 핵막 벽을 형성하면서 약 특유의 모양을 갖춘다. 분화가 완성된 약은 형태 유지와 열개 기능을 하는 비생식 세포와 소포자 및 화분으로 발달되는 생식성 세포로 구분된다. 비생식성 세포로는 열개와 관련 있는 연결부와 circular cell cluster, 화분에 영양 공급과 화분벽 형성을 돕는 융단조직(tapetum), 4개의 화분낭을 지지해주는 약격 외에도 상표피, 자낭내피 등이 있다. 생식성 세포는 이배체인 화분모세포가 감수 분열하여 생성된 4개의 반수체 소포자가 들어 있는 사분자(tetrad)가 화분낭 안에 형성되며 여기서 방출된 어린 소포자가 2 핵 또는 3 핵의 다세포성 응성 배우체, 즉 화분으로 분화, 발달된다(McCormick, 1993; Scott 등, 1991b; Goldberg, 1988).

약 특이 발현 유전자는 약 조직에서만 특이하

게 발현되거나 다른 조직에서보다 더 많이 발현되는 유전자로서 cDNA 클론들 및 게놈 클론들이 다수 분리되었다. 약 특이 발현 유전자는 그 발현 장소에 따라 아포체(sporophytic) 조직에서만 발견되는 것, 화분 같은 배우체(gametophytic) 조직에서만 나타나는 것, 두 조직에서 공통적으로 발현되는 것으로 세분할 수 있다. 소포자 발달 초기의 약에는 약 26,000개의 서로 다른 유전자의 전사체(transcripts)가 있으며 그 중 11,000개 정도가 약 특이일 것으로 계산되었다(Kamalay와 Goldberg, 1980과 1984). 또한 이들 유전자들은 약 발달 과정에 따라서 일정한 시기에 발현되고 있고(Koltunow 등, 1990; McCormick 등, 1994; Scott 등, 1991a), 그 조절은 mRNA 전사단계에서 이루어진다고 밝혀졌다(Kamalay와 Goldberg, 1984). 따라서 시간적 공간적으로 조절되고 있는 약 특이 유전자들의 발현 조절 체계를 밝히는 일은 복잡한 약조직의 분화, 발달 및 퇴화 과정을 이해하는데 매우 유용할 것이다.

최근에는 응성생식 기관인 약의 발달에 관한 분자생물학적 연구가 많이 수행됨에 따라 약에서만 특이적으로 발현되는 유전자 및 이 유전자를 조절하는 프로모터에 관한 연구가 담배, 토마토, 옥수수, 유채 및 버 등에서 활발히 이루어지

고 있으며, 이를 이용한 식물체의 응성불임 유도 등 많은 응용적인 연구가 여러 작물에서 또한 활발히 이루어지고 있다(Mariani 등, 1990 와 1992; Kim 등, 1998). 하지만 우리 나라 주요 채소작물인 배추의 유전자에 관한 연구는, 우리나라를 비롯하여 일본 등 동남아시아 지역에서 최근 활발히 이루어지고 있으나 아직 미진한 상태이다. 본 연구는 배추로부터 약 특이 유전자를 분리하여 약 특이 유전자들의 발현 양상을 조사함으로써 약조직의 분화, 발달 및 퇴화 과정을 이해하는데 매우 유용할 것이다. 또한 배추의 약 특이 유전자들을 이용하여 배추의 분자생물학적 연구와 이들 유전자들을 다른 작물에 응용할 수 있도록 개발코자 수행하였다. 한편 본 연구는 응성불임을 유도하기 위한 약 및 화분 발달 억제시기를 결정하는데 기초자료를 제공하고, 약 발달 시기별 발현 프로모터 탐색에 이용 가능한 cDNA 탐침(probe)을 제공할 것이다.

재료 및 방법

1. 시료 작물 및 채취

배추(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* 장원 F₁ hybrid 품종)를 온실에서 재배하여 개화시기에 미성숙꽃(꽃봉오리의 크기가 2mm 미만), 2mm 이상~ 5mm 이하의 꽃봉오리들을 채취하여 사용하였거나, 그 안에 있는 약을 분리 채취한 후 -70℃에 냉동 보관하여 시료로 사용하였다.

2. 조직관찰

크기가 1.5mm와 5.0mm인 꽃봉오리 조직을 FAA용액(95% ethanol 45mL, glacial acetic acid 5mL, formaldehyde 10mL, H₂O 40mL)에 15분 고정후 tertiary butanol 시리즈에 1시간씩 8회에 걸쳐 탈수시키고, paraplast(sigma P5808)에 embedding한 후 10um 두께로 절단하여 poly-lysine이 도말된 슬라이드(sigma P0452)에 올려놓고, xylene으로 파라핀을 제거한 후 광학현미경에서 200배로 관찰하였다.

3. cDNA분리 및 염기서열 결정

크기가 2.0mm에서 5.0mm 사이의 꽃봉오리로부터 순수하게 약 조직만을 채취후 RNA를 분리하고 이에 대한 cDNA를 합성하여 Lambda Zap EcoRI-XhoI 벡터에 약 cDNA 유전자 은행을 작성하였다(Kim, 1995). 약 cDNA 유전자은행에서 무작위로 분리한 cDNA클론을 대상으로 차별화 선별(dot-differential screening)하여 총 43개의 약특이 cDNA 클론을 선별하였다(Kim 등, 1996). 본 실험에서는 그 중 15개에 대한 염기서열 및 발현 양상을 조사하였다. cDNA 염기서열 결정은 Sanger의 방법(1977)으로 5'-말단 부분만을 행하였다. 이들 유전자에 대한 DNA 상동성 검색은 internet을 이용한 BLASTX search를 수행하였다.

4. 동위원소 표식 DNA 탐침(probe) 제조

Random priming 방법(Feinberg와 Vogelstein, 1983)을 사용하였다. 제한효소, *EcoRI-XhoI*으로 절단된 DNA 절편을 1% low melting temperature 아가로스 겔에서 분리한 후 해당 cDNA 단편을 포함하는 겔 조각을 65°C에서 용해시켜 phenol/chloroform/isoamyl-alcohol (25/24/1)로 1회씩 추출하고 ethanol에 침전시켜 정제하였다. 정제된 DNA 단편을 95°C에서 10분간 가열하여 변성시키고 random hexamer primer와 deoxynucleotides, [α -³²P]-dATP, Klenow fragment를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시키고, 반응되지 않은 nucleotides는 G-50 Sephadex column chromatography로 제거하였다. 또한 cDNA 단편 정제에는 QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 사용하기도 하였다. 정제방법은 생산자의 방법을 참고로 하였다.

5. Total RNA 분리 및 northern dot blot 분석

de Vries 등(1988)의 방법으로 배추 및 담배의 다양한 조직으로부터 total RNA를 분리하였다. 준비된 시료의 무게를 조사한 후 차갑게 한 유발에서 액체 질소로 시료를 얼려서 마쇄하여 차가운 튜브에 옮겼다. 마쇄된 시료 분말에 RNA 추출액(100mM LiCl, 100mM Tris-NaOH(pH 8.9), 1% SDS, 10mM EDTA)과 phenol을 동량 혼합하여 90°C로 미리 가열해 둔 용액을 시료 생체중 1g 당 2mL을 첨가하여 충분히 혼합하고 30°C에서 300rpm으로 5분간 흔들어서 주었다. 여기에 생체중 1g 당 1mL의 chloroform을 첨가하고 계속하여 30분간 흔들 후, 25°C에서 20,000xg로 30분간 원심 분리하여 상등액을 모으고 다시 시료 생체중 1g 당 1mL의 chloroform을 첨가하여 300rpm으로 30분간 흔들었다. 이것을 25°C에서 12,000xg로 15분간 원심 분리하여 상등액을 모으고 1/3 양의 8M LiCl를 혼합하고 4°C에 16시간 이상 보관하며 RNA를 침전시킨 후, 4°C에서 12,000xg로 30분간 원심 분리하여 2M LiCl와 80% 에탄올로 세척하고 건조시켜서 멸균수에 녹이고 -70°C에 보관하면서 사용하였다. 정제된 RNA의 농도를 UV 분광분석기로 정량하였다. 정제된 RNA 10ug씩을 1.2% formaldehyde 아가로스 겔에 전기영동하고 나일론 막을 옮긴 후 [³²P]로 표식된 탐침으로 혼성화 반응을 시키고 X-ray 필름에 노출시켰다. Northern dot blot에는 정제된 RNA의 4ug/dot 양에 10X MOPS 용액과 37% formaldehyde를 각각 1X 및 6.4% 되도록 첨가하고 끓는 물에서 2분간 가열하여 변성시킨 후 진공 장치를 이용해서 나일론 막에 부착하였다. 그 후의 과정은 상기와 동일한 방법에 준하였다.

결과 및 고찰

꽃봉오리의 생장은 약 및 화분의 발달이 꽃

기관에서 동시에 일어나는 세포학적, 형태적 변화이므로 꽃봉오리와 약의 길이성장이나 응성 배우체 발달 단계 사이에는 일정한 관계가 성립된다(Koltunow 등, 1990). Fig. 1의 A는 길이가 1.5mm 정도인 배추의 어린 꽃봉오리의 약의 단면으로 약 내벽에 층을 이룬 융단조직 및 사분자들을 볼 수 있으며, Fig. 1의 B는 5.0mm 길이의 성숙한 약의 단면으로 융단조직은 사라지고 성숙된 화분만을 볼 수 있다. 따라서 응성 배우체의 발달 정도와 꽃봉오리나 약의 크기에 대한 상관관계를 조사함으로써 어떤 크기의 꽃봉오리나 약에서 분리된 mRNA가 응성 배우체 발달의 어느 단계에 해당하는지 추정할 수 있을 것이다.

배추의 꽃을 채취한 후 건조되지 않도록 유지하면서 각 꽃봉오리의 꽃받침 바로 밑에서부터 꽃봉오리 끝까지의 길이를 해부현미경 하에서 측정된 후 그 꽃봉오리를 열게하여 약의 길이를 측정하였다(Fig. 2). 꽃봉오리의 길이가 3.0mm이고 약의 길이가 2.0mm일 때까지는 꽃봉오리와 약의 길이 증가는 직선에 가까운 비례 관계를 보였으나, 꽃봉오리의 길이가 4.0mm를 넘으면서 약의 길이 증가는 둔화되었으며 최대 길이는 2.8mm 내외였다. 그 후에도 꽃봉오리의 길이는 계속 증가되어 7.0mm 정도까지 생

장하였으며 그 때부터 개화되기 시작하였다. 한편 1.5mm의 꽃봉오리에서는 사분자만이 관찰되었으나 2.5mm의 꽃봉오리에서는 화분이 관찰된 것으로 보아 그 사이에서 소포자 방출이 이루어졌음을 짐작할 수 있었다. 이 결과는 Scott 등(1991a)이 유채에서 조사한 결과와 거의 일치하였다. 따라서 배추가 유채와 같은 Brassicaceae에 속하는 근연종이므로 꽃봉오리 및 약의 길이와 관련된 유채의 응성 배우체 발

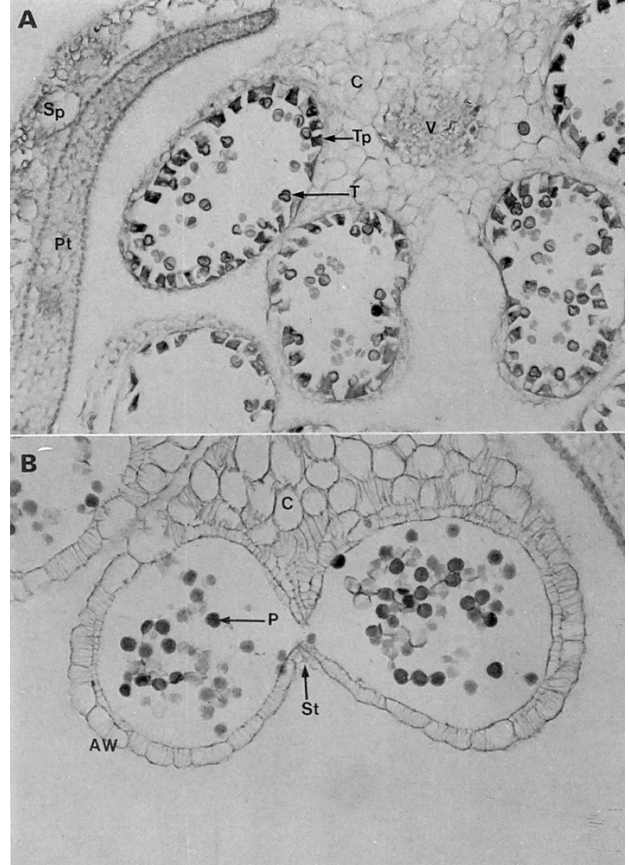


Fig. 1. Cross-section of the Chinese cabbage anther. Tapetum cells and tetrads were shown in the young anther (A), but only mature pollens in the mature anther (B). AW: anther wall; C: connective; P: pollen; Pt: petal; Sp: sepal; St: stomium; T: tetrads; Tp: tapetum cell; V: vascular bundle.

Table 1. The anther-expressed cDNA clones of Chinese cabbage used in northern dot blot analyses.

Clone	cDNA size (kb)	Protein sequence similarity ^z	Species	Expression tissue
BAN5	2.50	N/S ^y		anther
BAN10	0.25	N/S		anther
BAN32	0.40	N/S		anther
BAN33	0.24	N/S		anther
BAN52	1.30	polygalacturonase	<i>B. napus</i>	pollen
BAN54	0.27	Bp4c	<i>B. napus</i>	early microspore
BAN57	0.49	N/S		anther
BAN62	0.80	N/S		anther
BAN84	1.10	ascorbate oxidase	<i>B. napus</i>	pollen
BAN87	0.90	N/S		anther
BAN101	0.90	H ⁺ -translocating ATPase	tobacco	anther
BAN102	0.39	N/S		pollen
BAN103	0.45	N/S		pollen
BAN215	1.60	pectin esterase	<i>B. napus</i>	pollen
BAN229	0.90	N/S		anther

^zProtein sequence similarity was identified using the protein identification resource (PIR) database.

^yNo similarity was found in PIR database.

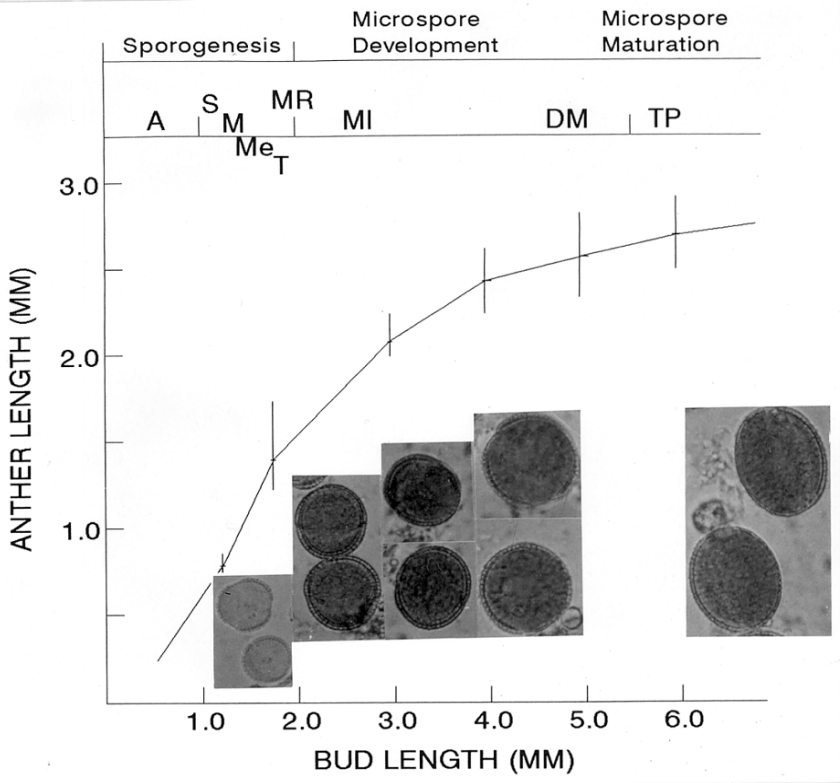


Fig. 2. The relationship between anther and flower bud length, and pollen development in the Chinese cabbage. The data are presented as a best fit curve through a scatter plot. Pollens were collected from the flower buds of 1.5 mm, 2.5 mm, 3.0 mm, 4.5 mm in length and the dehisced anthers. The cytological progression and major events in male gametogenesis were noted. A: achespore; S: sporocyte; M: meiocyte; MI: microspore interphase; DM: dinucleate microspore; TP: trinucleate pollen.

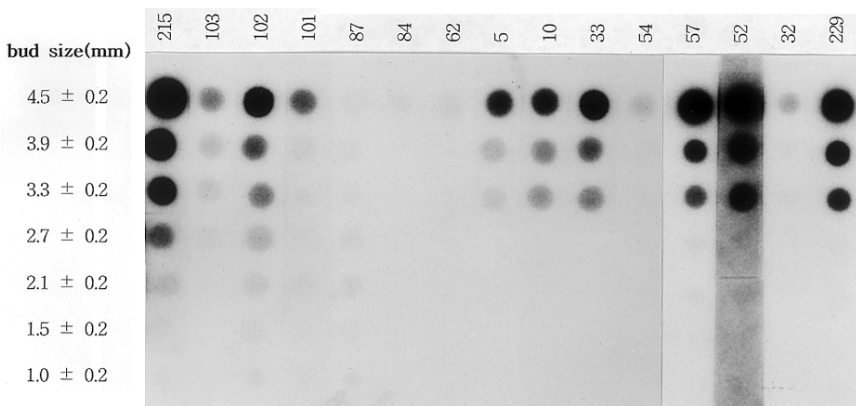


Fig. 3. Northern dot blots of fifteen anther-expressed cDNA clones of Chinese cabbage. Total RNAs were isolated from flower bud of 1.0 mm to 4.5 mm in length as indicated and hybridized with the [³²P]-labeled probe of each clone.

달 관계에 관한 Scott 등(1991b)의 해부학적인 관찰 결과를 실험에 참고하였다.

본 실험에 사용된 배추의 약 cDNA 유전자 은행은 길이가 2.0~5.0mm인 꽃봉오리의 약에서 분리된 mRNA로 만들어졌으며, 배추의 잎 cDNA 유전자 은행과 차별화 검정을 통하여 다수의 약 발현 클론을 선발하였다(Kim 등, 1996). 선발된 약 발현 클론들의 5'쪽의 부분 염기 서열 분석 결과와 protein identification resource database에 보고되어 있는 유전자들의 유사성 조사에서 BAN52는 polygalacturonase, BAN84는 ascorbate oxidase, BAN101은 H⁺-translocating ATPase, BAN-

229는 pectin esterase 유전자와 유사성을 보였으나, 그 외 클론들은 전혀 유사성을 찾을 수 없었다(Table 1). 이러한 cDNA 클론들 중 서로 다른 15개의 클론들을 제한효소 EcoRI과 XhoI으로 처리하여 벡터로부터 cDNA 단편들을 아가로스 겔상에서 분리, 그 크기를 확인한 후 벡터를 제외한 각각의 cDNA 단편들을 추출하였다. cDNA 단편들은 대략 0.5-1.5kb 정도의 크기였다. 추출된 DNA 단편들 각각을 random primer를 사용하여 [³²P]-dATP로 표식한 후 탐침으로 이용하였다.

배추 꽃봉오리의 크기를 1.0mm, 1.5±0.2mm, 2.1±0.2mm, 2.7±0.2mm, 3.3±0.2mm,

3.9±0.2mm, 4.5±0.2mm의 7개 그룹으로 나누어 각 그룹의 total RNA를 추출하여 각각의 RNA 농도를 UV 흡광도로 조사한 후, formaldehyde 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다(자료미제시). 정제된 각각의 total RNA(4ug/dot)를 변성시킨 후 진공장치를 이용하여 나일론 막에 전이시킨 다음 [³²P]로 표식된 각각의 cDNA 탐침으로 northern dot blot 분석을 하였다(Fig. 3). 사용된 약 발현 유전자 클론들을 전사(transcription) 시기에 따라 몇 개의 그룹으로 나눌 수 있었는데 BAN5, 10, 33, 52, 57, 102, 103, 215, 229의 전사체(transcripts)는 꽃봉오리 길이가 2.1mm 내의 일 때부터 출현이 시작되어 약 발달과 함께 그 양이 점차 증가되었으므로 소포자의 발달과 화분의 성숙에 관련된 유전자로 추측된다. BAN32, 54, 62, 84, 101의 전사체는 꽃봉오리 길이가 3.9mm 정도인 약 발달 후기부터 나타났고, BAN87 전사체는 그 양은 적지만 약 발달 초기부터 후기까지 존재하였다(Fig. 3).

BAN52 클론은 유체의 화분 특이 polygalacturonase(PG) 유전자와 90% 이상의 염기서열 상동성을 보였는데(자료미제시) 그 발현 시기가 유체의 PG 유전자 Sta44-4와 같이 단핵 소포자 후기부터 나타나 삼 핵 소포자일 때 최대가 되었으며(Fig. 3), 담배의 Npg1이 화분 발달 후기에 발현된다는 보고(Tebbutt 등, 1994)와 일치하였다. 유체의 ascorbate oxidase 유전자와 상동성을 보이는 BAN84 클론의 발현 패턴 역시 ascorbate oxidase와 상동성을 갖는 담배의 화분 특이 cDNA 클론인 NTPc303의 유전 발현 양상이 이 핵 소포자 중기부터 화분관에까지 나타나고 있다는 결과(Weterings 등, 1995)와 일치하고 있다.

약 발현 클론들의 전사시기 분석결과는 각 클론들이 분리된 유전자 은행의 재료가 되었던 약 조직의 발달상태와 일치함을 보였는데, Scott 등(1991a)은 소포자의 감수분열 이전의 약에는 용단조직 특이 유전자의 전사체가 매우 우세하며, 감수분열 후에는 화분발달과 관련된 소포자 특이 전사체가, 그리고 화분성숙기에는 화분 발아 및 화분관 성장에 관계된 전사체가 많다고 보고하였다. Klotunow 등(1990)은 담배의 미숙 약을 사용한 경우 TA29 등과 같은 용단조직 특이 클론들을 다수 분리하였고, 토마토의 성숙 화분을 재료로 한 Twell 등(1989)은 LAT52등 화분성숙과 발아 및 화분관 신장에 관련된 클론들을 다수 분리하였다. 따라서 Fig. 3의 각 클론들의 전사패턴과, 실험에 사용된 cDNA 유전자 은행이 소포자 방출 후인 2.0-5.0mm 길이의 꽃봉오리로부터 작성되었음을 고려할 때, Table 1의 클론들은 용단조직 특이 클론이라기보다는 화분 발달과정부터 그 이후과정에 관련된 클론들이 우세할 것으로 판단된다.

한편 본 연구의 응용적 목적은 다양한 약 특이 프로모터의 확보 및 세포과피 유전자 및 그 antisense 유전자를 이용한 음성 불임 유기 및

회복에 있다. 최근 많은 작물에서 다양한 목적으로 다양한 유전자의 활성을 억제하기 위하여 antisense 유전자가 이용되었지만 대상 유전자의 발현을 완벽하게 억제할 경우는 드물었다. 따라서 antisense 및 RNA-RNA 반응에 의한 유전자 발현 억제의 기작에 관한 추정에 근거하여 독성 유전자는 그 특성상 적은 양의 발현으로도 세포를 죽이기에 충분하기 때문에 활성이 약한 프로모터를 이용하고, antisense 유전자는 같은 시기의 활성이 강한 프로모터를 사용하여 임성 회복을 시도하고 분석하고자 계획하였다. 한편 Fig. 3의 결과로부터 (northern dot blot에서의 반응 정도만으로 어떤 유전자 한 copy의 전사량 즉, 그 유전자의 프로모터 강도를 단정하기는 어려우나) Kim(1995)에 의해 이미 연구되어 있는 BAN229(BAN215와 동일한 클론) 프로모터를 활성이 강력한 것으로 하고, 그것보다 약한 것으로 BAN102와 BAN103 프로모터를 채택하여 그들의 유전자 및 프로모터의 특성에 관한 조사를 할 계획이다.

초 록

배추의 약(anther) 발달에 관여하는 유전자를 분리, 특성을 구명하고, 궁극적인 목표로는 특이 발현을 조절하는 프로모터를 분리 작물의 응성불임 유기 및 임성회복에 응용하고자 본 연구를 수행하였다. 배추 약 cDNA 유전자 은행으로부터 차별화 선별(differential screening)에 의해 얻어진 15개의 약특이 유전자들의 부분 염기서열 결정 후 기존에 보고된 유전자들과 상동성 검색을 통해 그 기능을 추정해 본 결과 cDNA clone BAN52는 polygalacturonase, BAN84는 ascorbate oxidase, BAN101은 H⁺-translocating ATPase, BAN2는 pectin esterase 유전자와 상동성을 보였으나, 그 외 유전자들은 상동성이 없어 그 기능을 추정할 수 없었다. 상기 유전자들의 발현시기를 꽃 발달 시기별로 조사한 결과 대부분의 유전자들이 (BAN5, 10, 33, 52, 57, 102, 103, 215, 229) 꽃봉오리 2.1mm 내외에서 발현이 시작하여 성숙화분까지 그 발현양이 증가하였고, BAN32, 54, 62, 84, 101는 꽃봉오리 3.9mm인 약발달 후기부터 나타났고, BAN87 유전자는 그 양은 적지만 약 발달 초기부터 후기까지 발현하였다.

추가 주요어 : 사분자, 약, 응성불임, 융단조직,

전사, cDNA

인용문헌

- de Vries, S., H. Hoge, and T. Bisseling. 1983. A plant DNA mini-preparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Feinberg, A. and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Bioch.* 132:6-13.
- Goldberg, R.B. 1988. Plant: Novel developmental processes. *Science* 240:1460-1466.
- Kamalay, J.C. and R.B. Goldberg. 1980. Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell* 19: 935-946.
- Kamalay, J.C. and R.B. Goldberg. 1984. Organ-specific nuclear RNAs in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2801-2805.
- Kim, H.U. 1995. Production of male sterile tobacco plants using an anther-specific promoter recombinant. Ph.D. Thesis, Seoul Natl. University.
- Kim, H.U., B.S. Park, T.Y. Chung, and S.K. Kang. 1996. Isolation of anther-preferential expressed genes from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) *Mol. Cells* 6: 666-672.
- Kim, H.U., B.S. Park, Y.D. Park, and Y.M. Jin. 1998. Pollen ablation of transgenic tobacco plants by expression of the diphtheria toxin A-chain gene under the control of a putative pectin esterase promoter from Chinese cabbage. *Mol. Cells* 8: 310-317.
- Koltunow, A.M., J. Truettner, K.H. Cox, M. Wallroth, and R.B. Goldberg. 1990. Different temporal and spatial gene expression pattern occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1201-1224.
- Mariani, C., M.D. Beuckeleer, J. Truettner, J. Leemans, and R.B. Goldberg. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741.
- J. Mariani, V. Gossele, M.D. Beuckeleer, Block, R.B. Goldberg, W.D. Greet, and J. Leemans. 1992. A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384-387.
- McCormick, S., J. Yamaguchi, and D. Twell. 1991. Deletion analysis of pollen-expressed promoters. *In vitro Cellular and Development Biology Plant* 27:15-20.
- McCormick, S., C. Curie, Y. Eyal, J. Muschietti, L. Dircks, and R. Kulikauskas. 1994. Molecular biology of male gametogenesis. *Euphytica* 79: 245-250.
- McCormick, S. 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequence with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Scott, R., E. Dagless, R. Hodge, W. Paul, I. Soufleri, and J. Draper. 1991a. Pattern of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 17: 195-207.
- Scott, R., R. Hodge, W. Paul, and J. Draper. 1991b. The molecular biology of anther differentiation. *Plant Science* 80: 167-191.
- Tebbutt, S.J., H.J. Roger, and D.M. Lonsdale. 1994. Characterization of a tobacco gene encoding a pollen-specific polygalacturonase. *Plant Mol. Biol.* 25: 283-297.
- Twell, D., R. Wing, J. Yamaguchi, and S. McCormick. 1989. Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol. Gen. Genet.* 217: 240-245.
- Weterings, K., W. Reijnen, G. Wijn, van K. Deheuver, N. Appeldoorn, G. Dekort, van M. Herpen, J. Schrauwen, and G. Wullems. 1995. Molecular characterization of the pollen-specific genomic clone NTPg303 and *in situ* localization of expression. *Sex. Plant Reprod.* 8: 11-17.