

NAD-IDH 亚基 1 基因在油菜花粉与种子发育过程中的表达规律

陈喜文 陈德富* 陈海浪

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 以甘蓝型油菜不同发育时期的花粉与种子为材料, 开展了有关 NAD-IDH 亚基 1 基因表达规律的研究。结果表明, 不同发育时期花粉与种子的 NAD-IDH 比活力均比叶片的高。花粉与种子发育过程中 NAD-IDH 比活力均呈抛物线状变化, 这与亚基 1 基因的 RNA 定量斑点杂交和定量 RT-PCR 揭示的花粉与种子发育过程中 NAD-IDH 亚基 1 基因 mRNA 量的变化规律完全一致, 即油菜 NAD-IDH 亚基 1 基因的表达受 mRNA 水平调控。不同品种(系)间叶片 NAD-IDH 比活力研究发现, 油菜品种(系)间存在显著差异, 但这种差异不是由亚基 1 基因的 mRNA 量差异所致, 而是受转录后水平调控。本文也对 NAD-IDH 亚基 1 基因异常转录与农艺特性之间的关系进行了讨论。

关键词: NAD⁺-依赖型异柠檬酸脱氢酶; 酶比活力; 基因异常转录; 发育
中图分类号: Q5, Q7, S565

The Gene Expression Pattern of NAD-IDH Subunit 1 during the Development of Pollen and Seed in *Brassica napus*

CHEN Xi-Wen, CHEN De-Fu*, CHEN Hai-Lang

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: NAD⁺-isocitrate dehydrogenase is a nuclear-encoding enzyme residing in mitochondria. The enzyme in *Brassica napus* is composed of three subunits encoded by three genes designated as *Bnidh0*, *Bnidh1* and *Bnidh2*. In the earlier work we have found that the sequence of *Bnidh1* cloned from Shaan 2A and Shaan 2B is not completely homology. There was a deletion existing in 14% - 33% of *Bnidh1* clone. In order to further understand its function and its relation with the agronomical characters, RNAs at different developmental stages of pollens and seeds in *Brassica napus* were used to study the gene expression of NAD-IDH subunit 1. The results indicated that NAD-IDH specific activity both in pollens and seeds were higher than in leaves. The NAD-IDH specific activity showed a parabolic curve-like changing pattern during the process of pollen or seed development (Fig. 1, Fig. 2). That was completely coincident with the changing pattern of the expressed mRNA amount, which was detected by quantitative dot hybridization and quantitative RT-PCR (Fig. 3, Fig. 4). It suggested that the gene expression of NAD-IDH both in pollens and seeds was regulated by the level of mRNA. The significant difference of leaf NAD-IDH specific activities was occurred in different cultivars or lines. Topas had the highest specific activity with 1.22 U/mg protein, while Ken C1 had relatively lower specific activity with 0.96 U/mg protein and Shaan 2B had the lower specific activity with 0.57 U/mg protein and Shaan 2A had the lowest specific activity with 0.38 U/mg protein (Table 1). But the difference was not caused by the expressed mRNA amount (Fig. 5). Thus the expression of NAD-IDH in leaf was regulated by posttranscriptional mechanism. The agronomical characters affected by NAD-IDH were also discussed in this paper.

Key words: NAD⁺-isocitrate dehydrogenase (NAD-IDH); Enzymatic specific activity; Abnormal transcription; Development

NAD⁺-依赖型异柠檬酸脱氢酶(NAD⁺-isocitrate dehydrogenase, 简称为 NAD-IDH; EC 1.1.1.41) 是一

个核编码的线粒体酶, 具有别构酶特性。在三羧酸循环中负责催化异柠檬酸氧化脱羧成 α -酮戊二酸,

基金项目: 教育部高等学校骨干教师资助计划(00-65)和留学回国人员科研启动基金(2003-406)资助。

作者简介: 陈喜文(1966-), 博士, 副教授, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究。*通讯作者(Corresponding author): 陈德富(1965-), 博士, 教授, 主要从事分子遗传学研究。Tel: 022-23500133; E-mail: chendefu@nankai.edu.cn

Received(收稿日期): 2004-07-02, Accepted(接受日期): 2004-11-25.

并将NAD⁺还原成NADH,是最重要和最具调控意义的限速酶^[1]。NAD-IDH还参与植物体内的氮代谢^[2]、乙醛酸循环^[3]等多种生化代谢途径,还是某些线粒体基因mRNA的结合蛋白,具有调控线粒体基因翻译的能力^[4]。现有研究表明,不同物种NAD-IDH的亚基组成不同^[5,6]。拟南芥NAD-IDH被认为是由两种亚基组成的异源八聚体,但此两亚基组装的酶并不具有催化的功能^[7]。笔者在前文^[8]中报道拟南芥和甘蓝型油菜中NAD-IDH由3种亚基组成,体外蛋白质合成研究显示3种亚基以2:1:1的比例组成有活性的全酶,其中亚基0可能为催化亚基,亚基1和2可能为调节亚基。编码3个亚基的基因分别是*Bnidh0*、*Bnidh1*和*Bnidh2*。育性不同的材料,其克隆的基因序列并不完全相同。*Bnidh0*和*Bnidh2*在油菜三系中序列完全相同,而*Bnidh1*在来源于不育系“陕2A”和保持系“陕2B”的不同克隆中,序列并不完全相同,其中14%~33%的*Bnidh1*基因序列存在碱基缺失的现象。因此,以*Bnidh1*基因来研究植物发育过程中NAD-IDH基因的表达规律,将有助于进一步了解该酶的功能,有助于阐明其调控的生命现象。关于NAD-IDH基因表达规律,目前仅见于甘蓝型油菜和黄瓜种子萌发过程中基因转录规律的研究报道^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 甘蓝型油菜(*Brassica napus*)包括Topas、陕2A、陕2B和垦C1等品种(系)。Topas由加拿大农业与农业食品研究中心Li X-Q研究员馈赠。陕2A、陕2B和垦C1由陕西省杂交油菜研究中心李殿荣研究员馈赠。陕2A是一种细胞质雄性不育系,陕2B是陕2A的保持系,垦C1是陕2A的恢复系^[10]。所有供试材料播种在25和15 h光照/9 h黑暗的人工气候室中。花期取其幼叶(顶叶)或生长良好的主花序或一次分枝上的花蕾、角果为试验材料。花蕾采集后,于冰浴上按蕾长大小将花粉分成6个发育时期,蕾长大小与花粉发育时期的关系参见文献^[11]。角果采集后,于冰浴上剥开,取其种子(含胚),按角果宽度将种子分成6个发育时期^[12]。

1.1.2 试剂 MOPS购自美国Research Organics公司。-NAD⁺购自日本Oriental Yeast公司。Adenosine 5'-monophosphate (AMP)、Diethyl pyrocarbonate

(DEPC)购自美国Sigma公司。threo-Ds-isocitrate购自美国ICN Biomedicals公司。[-³³P] dCTP购自北京亚辉生物医学工程公司。HybondTM-N⁺购自Amersham公司。

1.2 方法

1.2.1 NAD-IDH粗提液的提取 按文献^[11]方法提取叶片或花粉线粒体。按文献^[12]方法提取种子线粒体。线粒体沉淀悬浮于含40 mmol/L MOPS(pH 7.4)及10 mmol/L β-巯基乙醇的缓冲液中,-70 ℃下冻融裂解线粒体。裂解液经15 000 ×g、4 min离心,上清液即为酶粗提液。

1.2.2 NAD-IDH比活力分析 按文献^[8]方法测定叶片、花粉或种子粗提液NAD-IDH比活力。酶活力单位(U)定义为每分钟产生1 nmol NADH所对应的酶量。蛋白含量的测定采用Bradford^[13]方法。酶比活力为1 mg蛋白对应的酶活力,取3~4次重复试验的平均值。处理间差异经新复极差检测。

1.2.3 探针制备 按华美生物工程公司缺口平移试剂盒说明,标记来自垦C1的*Bnidh1*基因(命名为*Bnidh1-C*^[8])。GenBank注册号:AY216773)。

1.2.4 RNA定量斑点杂交分析 按文献^[12]方法。细胞质总RNA点样量分别为8、4、2、1、0.5和0.25 μg。杂交膜为HybondTM-N⁺。黑暗下曝光24 h或144 h。依软件Gel-Pro Analyzer 4.0(美国Media-Cybernetics公司)分析杂交斑点亮度。

1.2.5 定量RT-PCR分析 按文献^[14]方法提取叶片及不同发育时期花粉与种子的总RNA,富集其poly(A)⁺mRNAs,合成其第一链cDNAs。cDNAs合成后,浓度调至12.5 ng/μL,取2 μL加样于25 μL PCR体系。在*Bnidh1-C*与其同源亚基基因*Bnidh0-C*(AY216770)和*Bnidh2-C*(AY216776)差异碱基处设计PCR引物对5'-GCCACCA GGCATGAGAAAT-3(位于*Bnidh1-C*的+402~+420)和5'-AGACACCGTG GATCATAACCG-3(位于*Bnidh1-C*的+1202~+1183)。该引物对在*Bnidh1-C*基因上所能扩增的理论长度为801 bp。PCR用的DNA聚合酶为宝生物工程(大连)有限公司的Ex-TaqTM。反应体系遵照厂家说明,反应过程为94 ℃,5 min;94 ℃,40 s,57 ℃,40 s,72 ℃,90 s,30个循环(或36个、或42个循环);72 ℃,7 min。取8 μL PCR产物于1%琼脂糖凝胶上电泳分析其特异带亮度。依软件Gel-Pro Analyzer 4.0分析亮度。

2 结果与分析

2.1 不同发育时期花粉与种子 NAD-IDH 比活力分析

从图 1 可以看出,不同发育时期花粉的 NAD-IDH 比活力显著不同。花粉发育过程中 NAD-IDH 比活力变化呈抛物线状。从四分体、单核期、双核期至三胞期逐渐增加,至三胞期达最高点,垦 C1 为 6.70 U/mg 蛋白,Topas 为 6.89 U/mg 蛋白;其后逐渐下降,直至成熟期,此时酶比活力与四分体时处于同一水平。Topas 和垦 C1 均呈现出同样的变化规律,但各时期 Topas 酶比活力均比垦 C1 的高。各发育时期花粉的 NAD-IDH 比活力都比叶片的(1.02 U/mg 蛋白)高。与叶片相比,花粉发育过程中需要更多的 NAD-IDH,因其能量代谢更为旺盛。

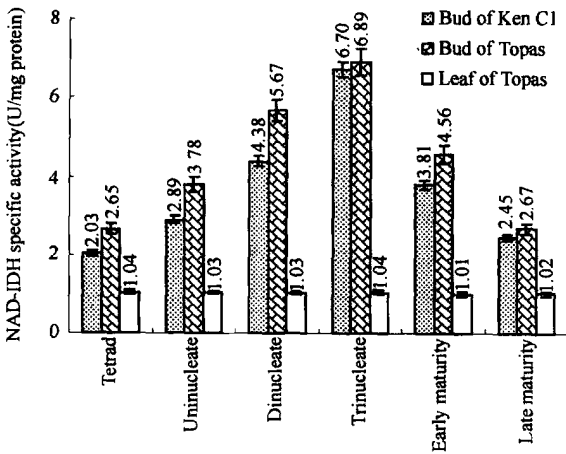


图 1 Topas 与垦 C1 花粉发育过程中的 NAD-IDH 比活力比较
Fig. 1 The comparison of NAD-IDH specific activities during pollen developmental process in Topas and Ken C1

从图 2 可以看出,不同发育时期种子的 NAD-IDH 比活力变化规律与花粉基本一致。在种子发育早期, NAD-IDH 比活力伴随种子的发育而增高,到 2.3 ~ 3.2 mm 角果时期达最高值,此时垦 C1 为 5.02 ~ 5.06 U/mg 蛋白,Topas 为 7.89 ~ 7.98 U/mg 蛋白;随后逐渐下降,但与花粉相比,下降的趋势相对平缓。角果发育后期的酶比活力仍显著高于角果发育前期的酶比活力。表明与花粉不同,种子发育后期仍需要较为旺盛的能量代谢。

2.2 不同发育时期花粉与种子 NAD-IDH 亚基 1 基因 mRNA 的定量分析

蛋白质(酶)源于其 mRNA 的翻译。不同发育时

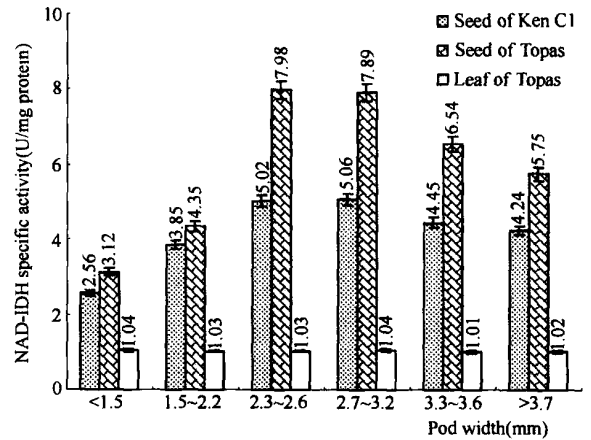


图 2 Topas 与垦 C1 种子发育过程中的 NAD-IDH 比活力比较
Fig. 2 The comparison of NAD-IDH specific activities during seed developmental process in Topas and Ken C1

期花粉与种子 NAD-IDH 比活力均比叶片的高,且其变化呈抛物线状,这是否由其 mRNA 量的差异所致?为此,我们以 Topas 为材料,采用 RNA 定量斑点杂交和定量 RT-PCR 两种方法分析了花粉或种子发育过程中 NAD-IDH 亚基 1 基因的转录规律。结果见图 3 和图 4。

花粉发育过程中 RNA 定量斑点杂交结果显示,在四分体期、单核期、双核期、三胞期、成熟早期及成熟晚期,杂交出明显亮斑的最少 RNA 量分别为 2.0 μg、1.0 μg、0.5 μg、0.25 μg、0.5 μg 和 2.0 μg (图 3-A)。即该基因表达的 mRNA 量在三胞期最高,双核期和成熟早期次之,单核期较低,四分体期和成熟晚期最低。叶片则至少需要 2.0 μg RNA 才有明显杂交亮点,显示叶片中该基因 mRNA 量很低。

为避免同源基因对杂交信号的影响,笔者时进行了 *Bnidh1-C* 基因的定量 RT-PCR 分析,其结果见图 3-B。从中不难看出,亚基 1 基因 mRNA 量的变化规律与 RNA 定量斑点杂交的变化规律完全一致,这种 mRNA 量的变化规律与酶比活力(图 1)规律完全一致,也呈良好的抛物线状。

不同发育时期种子 RNA 定量斑点杂交结果(图 4-A)显示,在 2.3 ~ 3.2 mm 角果期出现明显亮斑需要的最少 RNA 量最低,在此前后的各发育时期出现明显亮斑需要的最少 RNA 量都要高,且在此之前的各时期比在此之后的各时期需要的最少 RNA 量更高,亚基 1 基因的 mRNA 表达量的这种变化规律与其定量 RT-PCR 亮度(图 4-B)变化及酶比活力(图 2)规律也完全一致。

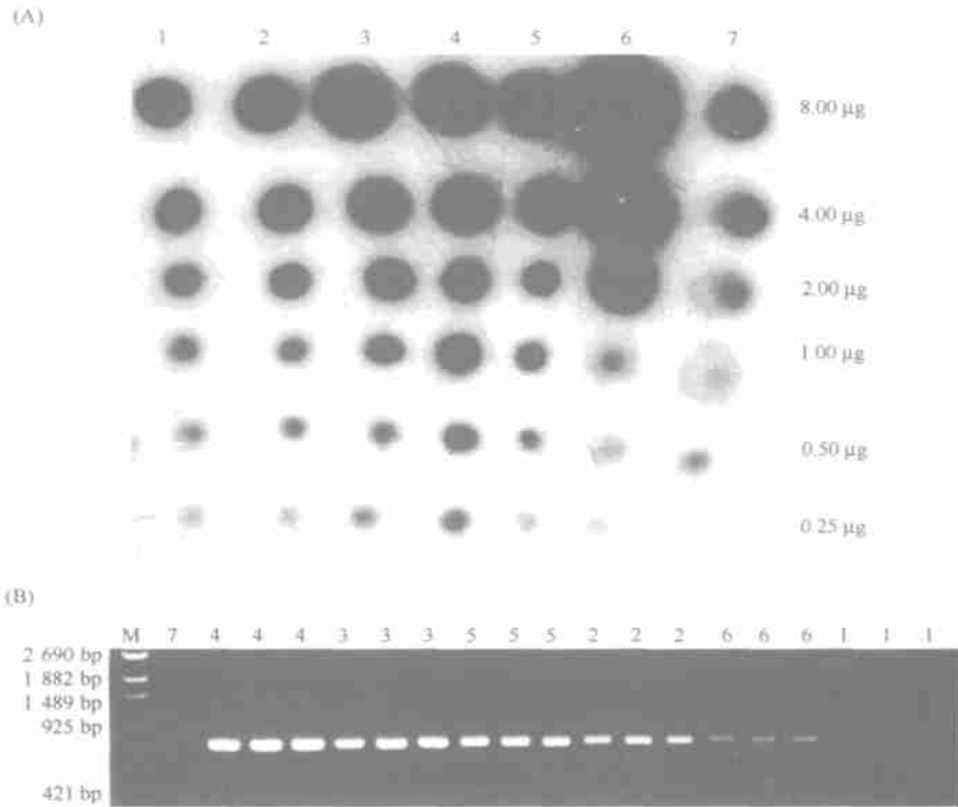


图 3 Topas 花粉发育过程中 RNA 定量斑点杂交(A, 曝光 24 h)及定量 RT-PCR(B, 30 循环)分析
 Fig. 3 The quantitative dot hybridization (A, exposure of 24 h) and RT-PCR (B, 30 cycles) of RNAs at different developmental stages of pollen in Topas

1:四分体;2:单核期;3:双核期;4:三核期;5:成熟早期;6:成熟晚期;7:叶片;M:- EcoT14I DNA 分子量标记。
 1: tetrad; 2: uninucleate; 3: dinucleate; 4: trinucleate; 5: early maturity; 6: late maturity; 7: leaf; M: DNA marker of EcoT14I.

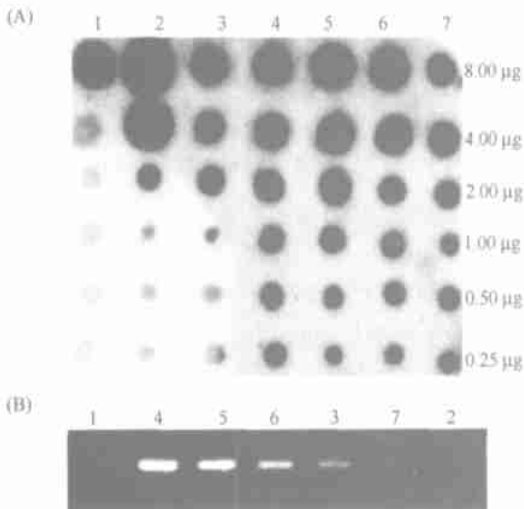


图 4 Topas 种子发育过程中 RNA 定量斑点杂交(A, 曝光 24 h)及定量 RT-PCR(B, 30 循环)分析
 Fig. 4 The quantitative dot hybridization (A, exposure of 24 h) and RT-PCR (B, 30 cycles) of RNAs at different developmental stages of seed in Topas

1:叶片;2:角果宽 < 1.5 mm;3:角果宽为 1.5 ~ 2.2 mm;
 4:角果宽为 2.3 ~ 2.6 mm;5:角果宽为 2.7 ~ 3.2 mm;
 6:角果宽为 3.3 ~ 3.6 mm;7:角果宽 > 3.7 mm。
 1: leaf; 2: pod width < 1.5 mm; 3: pod width is 1.5 ~ 2.2 mm;
 4: pod width is 2.3 ~ 2.6 mm; 5: pod width is 2.7 ~ 3.2 mm;
 6: pod width is 3.3 ~ 3.6 mm; 7: pod width > 3.7 mm.

2.3 品种(系)间叶片 NAD-IDH 比活力比较

从表 1 可以看出,油菜品种(系)间酶比活力存在显著差异,Topas 最高(1.22 U/mg 蛋白),为垦 C1 的 127.1%;恢复系“垦 C1”次之(0.96 U/mg 蛋白);保持系“陕 2B”再次之,为垦 C1 的 59.4%;不育系“陕 2A”最低,仅为垦 C1 的 39.6%或为陕 2B 的 66.7%。即陕 2A 的三羧酸代谢活性最低、陕 2B 次之、垦 C1 再次之、Topas 最高,这与其品种(系)农艺特性相吻合。在生产中,Topas 是广泛推广品种,垦 C1 也是正常可育的品系(制种用),植株高大,叶片宽厚,结荚率高。陕 2B 与陕 2A 一样,植株相对矮小。陕 2B 虽可育,但结荚率很低。陕 2A 花粉完全不育,需要其他材料提供花粉才能结荚,且结荚率非常低。

2.4 品种(系)间叶片 NAD-IDH 亚基 1 基因 mRNA 的定量分析

品种(系)间叶片 NAD-IDH 比活力差异是否由基因的 mRNA 表达量差异所致?本文以亚基 1 基因(*Bnidh1-C*)为探针对 4 个品种(系)叶片 RNA 进行

了定量斑点杂交和定量 RT-PCR 分析,结果见图 5。在试验设置的 RNA 点样量范围内,品种(系)间斑点亮度差异不明显,表明油菜品种(系)间叶片 NAD-IDH 基因在 mRNA 量上没有明显差异,也就是说油菜品种间叶片 NAD-IDH 比活力差异不是基因 mRNA 量差异所致。

表 1 不同品种(系)叶片 NAD-IDH 比活力比较

Table 1 The comparison of leaf NAD-IDH specific activities in different cultivars or lines

| 品种(系) Cultivar or line | 酶比活力 Specific activity (U/mg protein) ^{a)} | 酶相对活力 Relative activity (%) |
|---------------------------|---|-----------------------------------|
| 陕 2A Shaan 2A | 0.38 D | 39.6 |
| 陕 2B Shaan 2B | 0.57 C | 59.4 |
| 垦 C1 Ken C1 | 0.96 B | 100.0 |
| Topas | 1.22 A | 127.1 |

注:处理间数据经新复极差检测(1%水平)。

Note: Values followed by a different letter are significantly different as indicated by Duncan's Multiple Range Test at $P = 0.01$. A indicates the highest and D the lowest.

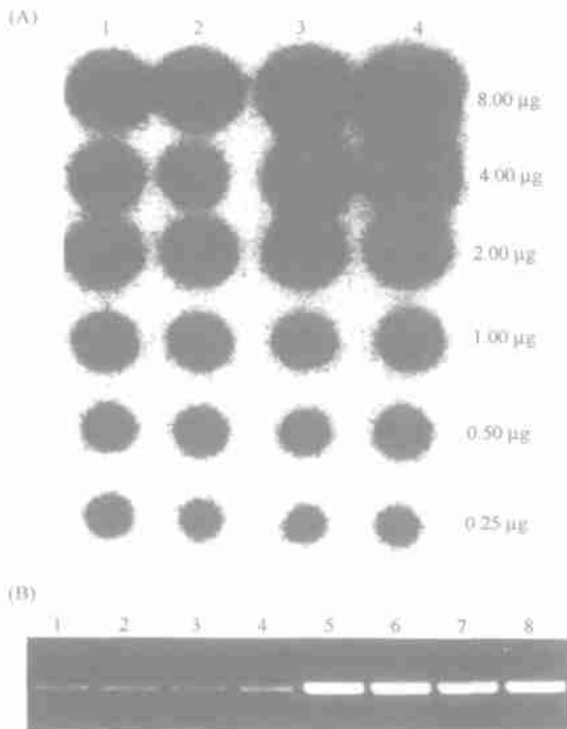


图 5 不同品种(系)的叶片 RNA 定量斑点杂交 (A, 曝光 144 h) 及定量 RT-PCR (B) 分析

Fig. 5 The quantitative dot hybridization (A, exposure of 144 h) and RT-PCR (B) of leaf RNAs from different cultivars or lines

1, 5: 陕 2A; 2, 6: 陕 2B; 3, 7: 垦 C1; 4, 8: Topas;
图 5-B 的泳道 1~4: 36 循环; 泳道 5~8: 42 循环。
1, 5: Shaan 2A; 2, 6: Shaan 2B; 3, 7: Ken C1; 4, 8: Topas;
Lane 1 - 4 in Fig. 5-B: 36 cycles; lane 5 - 8: 42 cycles.

3 讨论

NAD-IDH 是一个核编码的线粒体酶,在细胞核内转录成 mRNA,在细胞质中翻译成蛋白质,最后被转运到线粒体中发挥作用。NAD-IDH 比活力的比较发现,不同发育时期花粉与种子的酶比活力都明显高于叶片的,这暗示与叶片相比,花粉与种子发育过程中需要更多的 NAD-IDH,需要更高的能量代谢。这与前人报道的花药细胞对能量的需求量远远大于植物营养生长时期的结论^[15]一致。

不同发育时期的花粉或种子 NAD-IDH 比活力显著不同,但共同遵循着抛物线的变化规律,即随着发育的推进,酶比活力逐步提高,到某一个时期(花粉在三胞期,种子在 2.3~3.2 mm 角果时期)达到最高,然后再逐渐降低。由于 NAD-IDH 是三羧酸循环中的限速酶,因此推测在花粉与种子发育过程中,其能量代谢呈现一个由弱转强、再转弱的进程。RNA 定量斑点杂交和定量 RT-PCR 研究发现,酶比活力的这种抛物线变化规律与基因 *Bnidh1-C* mRNA 量的变化规律一致。换句话说,在花粉与种子发育过程中, NAD-IDH 是由 mRNA 控制的,由于 NAD-IDH 各亚基基因是单拷贝的^[7], Topas 和 垦 C1 又是正常可育的材料,因此我们推测正常可育油菜的花粉与种子 NAD-IDH 亚基 1 基因的表达不受转录后机制所制约。这与在油菜种子萌发 2~3 d 时 NAD-IDH 基因表达的规律相一致^[9],即 NAD-IDH 的表达受 mRNA 水平调控,而与黄瓜种子萌发过程中 NAD-IDH 基因表达的规律不同^[9]。

然而,当笔者将不育系陕 2A 和相应保持系陕 2B 的叶片 NAD-IDH 与正常可育的 Topas 及 垦 C1 的叶片 NAD-IDH 一起比较,发现品种(系)间酶比活力存在明显差异,但其亚基 1 基因 mRNA 定量分析结果几乎没有区别。也就是说,品种(系)间 NAD-IDH 亚基 1 基因 mRNA 量与酶比活力间没有相关性,即其 NAD-IDH 的表达受转录后水平调控,这与油菜幼苗发育过程中 NAD-IDH 基因表达规律相一致^[9],而且这种花粉、种子和叶片 NAD-IDH 基因调控机制的差异与前人报道结果一致^[9]。在能量代谢旺盛的组织中,其 NAD-IDH 的表达受 mRNA 水平调控;而在能量代谢较低或者光合作用的组织中,其 NAD-IDH 的表达受转录后水平调控。NAD-IDH 的转录后水平调控是限制三羧酸循环中碳类物质通过脱羧途径代谢的机制之一^[9]。

另外,前文^[8]中笔者发现,陕 2A、陕 2B、垦 C1 与拟南芥 NAD-IDH 在氨基酸组成上存在差异,但其体外表达的酶比活力并无差异,由此推测品种(系)间 NAD-IDH 比活力的差异不是其氨基酸序列的差异所致,而是由 NAD-IDH 亚基 1 基因 mRNA 异常引起。所以,尽管陕 2A 和陕 2B 的 mRNA 量与垦 C1 和 Topas 的差异不大,但由于陕 2A 和陕 2B 的亚基 1 基因 mRNA 中存在高达 14%~33% 的缺失突变,而这些缺失仅发生在几个碱基中^[8],因此 mRNA 在 RNA 定量斑点杂交中能与探针正常杂交,在定量 RT-PCR 后的电泳条带中也不会表现差异,但缺失突变的亚基却不能表现正常功能,从而导致活性 NAD-IDH 减少 14%~33%,影响细胞内能量代谢。由于叶片需要的能量和三羧酸循环代谢产物相对较少,因此,不影响叶片的正常发育。但对于需要更多能量和代谢产物的花粉或种子而言,也许这种异常转录对其发育的影响是致命的,这可能是引起植物雄性不育或花而不实的原因之一。由于雄性不育或花而不实的植物没有可供研究的花粉或种子,因此本结论仅仅是推测,需要更多的实验来验证。

References

- [1] Chen HL(陈海浪), Chen X-W(陈喜文), Chen D-F(陈德富). Advance on structure and function of NAD⁺-isocitrate dehydrogenase. *Letters in Biotech* (生物技术通讯), 2003, **14**: 304 - 307 (in Chinese with English abstract)
- [2] Lancien M, Ferrario-M ry S, Roux Y, Bismuth E, Masclaux C, Hirel B, Gadal P, Hodges M. Simultaneous expression of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase and other krebs cycle genes after nitrate resupply to short-term nitrogen starved tobacco. *Plant Physiol*, 1999, **120** (3): 717 - 726
- [3] Alvarez-Villafane E, Soler J, del Valle P, Busto F, de Arriaga D. Two NAD⁺-isocitrate dehydrogenase forms in *Phycomyces blakesleeanus* induction in response to acetate growth and characterization, kinetics, and regulation of both enzyme forms. *Biochemistry*, 1996, **35**(15): 4 741 - 4 752
- [4] Anderson S L, Minard K I, McAlister Henn L. Allosteric inhibition of NAD⁺-specific isocitrate dehydrogenase by a mitochondrial mRNA. *Biochemistry*, 2000, **39**(19): 5 623 - 5 629
- [5] Zhao W-N, McAlister Henn L. Affinity purification and kinetic analysis of mutant forms of yeast NAD⁺-specific isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1997, **272**(35): 21 811 - 21 817
- [6] Huang Y-C, Soundar S, Colman B F. Affinity cleavage at the divalent metal site of porcine NAD⁺-specific isocitrate dehydrogenase. *Protein Sci*, 2000, **9**(1): 104 - 111
- [7] Behal R H, Oliver D J. NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. Characterization of two closely related subunits. *Plant Mol Biol*, 1998, **36**(5): 691 - 698
- [8] Chen D-F, Chen X-W. Cloning and activity analysis of *in vitro* expression of plant NAD-IDH genes. *Chinese Science Bulletin*, 2004, **49**: 328 - 336
- [9] Falk K L, Behal R H, Xiang C, Oliver D J. Metabolic bypass of the tricarboxylic acid cycle during lipid mobilization in germinating oilseeds. Regulation of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase versus fumarase. *Plant Physiol*, 1998, **117**: 473 - 481
- [10] Li D-R(李殿荣). The primary report of breeding using three lines of the CMS of *Brassica napus* L. *Shaanxi J Agr Sci* (陕西农业科学), 1980, (1): 26 - 29(in Chinese)
- [11] Chen D-F(陈德富), Chen X-W(陈喜文), Zou W-G(邹卫国), Li X-Q(李修庆). An effective isolation technique for pollen mitochondrial RNA. *Plant Physiol Communication* (植物生理学通讯), 1999, **35**(3): 211 - 214 (in Chinese)
- [12] Chen D-F(陈德富), Chen X-W(陈喜文), Zhang J(张俊). Changes of total RNA yield and mitochondrial *nad6* gene transcription during the seed development in *Brassica napus*. *Chinese J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 1999, **21**(2): 1 - 4 (in Chinese with English abstract)
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 - 254
- [14] Chen D F, Kawarasaki Y, Nakano H, Yamane T. Cloning and *in vitro* and *in vivo* expression of plant glutathione S-transferase zeta class genes. *J Biosci Bioeng*, 2003, **95**:594 - 600
- [15] Przybylar-Zawislak B, Gadde D M, Ducharme K, McCammon M T. Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics*, 1999, **152**: 153 - 166