

利用 DAD1 反义片段转化创建菜薹可调控雄性不育材料

陈国菊¹, 徐 飞^{1,2*}, 雷建军^{1**}, 曹必好¹

(¹华南农业大学园艺学院, 广州 510642; ²吉林省蔬菜花卉科学研究所, 长春 130033)

摘 要: 菜薹因为没有好的雄性不育材料或自交不亲和系, 至今尚无一代杂种用于生产, 根据拟南芥及白菜型油菜的花药不开裂基因 *DAD1* 的保守序列设计引物, 扩增菜薹的 *DAD1* 基因片段 (*DAD1F*), 构建反义 *DAD1F* 植物表达载体, 用农杆菌介导法转化菜薹, 对转基因植株进行分子检测, 鉴定其雄性不育性并进行育性恢复试验。克隆得到的菜薹的 *DAD1* 基因片段大小为 678 bp, 命名为 *BrcpDAD1F*, 其序列与拟南芥和白菜型油菜的 *DAD1* 高度同源, 同源率分别为 88% 和 99%; 共得到了 12 株转基因植株, 有 6 株在转录水平上得到表达, 表现为雄性不育, 花器官畸形, 花粉活力低, 萌发率不到 10%, 且开花后不能结角果或结空角果, 或者得到极少种子但种子不萌发; 用对照的花粉给转基因植株授粉可使其正常结实。以 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯处理可使其雄性不育得到恢复, 花粉可以在柱头和培养基上萌发, 具有受精能力。 T_1 代可育株与不育株的比例都呈 1:3 分离, T_2 代不同株系的育性分离比例不同, 有些株系继续呈 1:3 的分离, 有些株系全是可育株或全是不育株, 说明反义抑制呈单基因稳定遗传。

关键词: 菜薹; 雄性不育; 花药不开裂基因; 茉莉酸; 反义 RNA

中图分类号: S 634.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 05-0685-08

Development of Adjustable Male Sterile Plant in Chinese Flowering Cabbage by Antisense *DAD1* Fragment Transformation

CHEN Guo-ju¹, XU Fei^{1,2*}, LEI Jian-jun^{1**}, and CAO Bi-hao¹

(¹College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ²Vegetable and Floriculture Scientific Research Institute of Jilin Province, Changchun 130033, China)

Abstract: There are not F_1 hybrids because of no good male sterile materials or self incompatible lines in *B. rassaica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *utilis* Tsen et Lee. In this experiment, in accordance with the conservative region of *DAD1* gene in *A. thaliana* and *B. campestris*, the primer was designed to amplify the *DAD1* gene conservative region fragment (*DAD1F*) of *B. campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*. Using this fragment to construct a antisense expression vector to develop adjustable male sterile plants. All opened flowers were removed from the inflorescence, and the remaining flowers were dipped into $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA (Wako Pure chemical, Osaka, Japan) dissolved in 0.05% aqueous Tween 20. The fragment amplified from *B. campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* was named as *BrcpDAD1F*. The homologous rates were 88% and 99% with that in *A. thaliana* and *B. campestris*, respectively. The antisense *DAD1F* from *B. campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*, was connected to plant expression vector pB II21. Using cotyledons with petiole as explants, *Agrobacterium tumefaciens* mediate transformation was performed with antisense *BrcpDAD1F* vector (pB-FantIBrcpDAD1F) into *B. campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*. The results of Southern blotting showed that antisense *DAD1F* had been transferred into *B. campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee. Twelve transformants were obtained, of which 6 the mRNA of *DAD1* were inhibited and displayed male

收稿日期: 2008 - 11 - 03; 修回日期: 2009 - 04 - 21

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (32293); 广东省国际合作项目 (2004B50201021)

* 并列第一作者; ** 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jilei@scau.edu.cn; Tel: 02085288262)

sterile, pollen germination percent of transgenic plants were very low, which were not than 10%. After flowering, transgenic plants could not set or the siliquas were empty. Occasionally we could obtain seeds, but the seeds could not germinate. Pollinated with wild type plant pollen, the siliquas of transformed plants were enlarged and the seeds could be produced. No obvious differences were observed in morphology between transformed plants and wild type plants. A few flowers in transformed plants were abnormal. The pollen treated with $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA could germinate in the medium and could fertilize. The fertile and sterile plants were in the ratio of 3 to 1 in T_1 population, 3 to 1 in some lines, full fertile in some lines full sterile in other lines in T_2 populations. It suggested that antisense RNA can inherit in Mendel model.

Key words: *B. brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *utilis* Tsen et Lee; male sterility; defective in anther dehiscence1; jasmonic acid; antisense RNA

菜薹 [*B. brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *utilis* Tsen et Lee] 在华南等地又称菜心。由于没有合适的雄性不育系用于杂种种子生产, 目前仍在利用常规品种, 因此迫切需要培育菜薹雄性不育系。

以前常用 *B. amara* 创造雄性不育材料, 如果是营养器官为产品的蔬菜, 虽然可以不用导入 *B. arvensis* 基因, 抑制 *B. amara* 基因的表达从而得到恢复系, 但雄性不育系自交繁殖后, 只能得到 50% 不育株, 还须淘汰 50% 的可育株, 才能用于杂种种子生产。

拟南芥花药不开裂基因 *DAD1* (defective in anther dehiscence1) 编码一个磷脂酶 A1 (PLA1), 它催化磷脂转化为亚麻酸, 这是茉莉酸生物合成的第一步。Ishiguro 等 (2001) 通过 T-DNA 插入获得一个磷脂酶基因突变体 *dad1*, 该突变体表现为雄性不育, 经检测 *dad1* 花蕾内茉莉酸含量只有野生型的 22%, 而外源施加适量茉莉酸或其合成前体亚麻酸, 可以完全恢复其育性 (McConn & Rowe, 1996; Mandaokar et al., 2003)。利用基因工程方法, 构建 *DAD1* 反义表达载体获得菜薹雄性不育材料, 然后通过外施茉莉酸使其育性得到恢复的研究, 至今尚未见报道。

本研究中根据拟南芥花药不开裂突变体 (雄性不育) 的特点, 将该突变体的野生型相对应的 *DAD1* 基因, 取其关键片段, 构建反义表达载体, 导入到优良杂种一代的母本植株中。由于该基因控制与雄性不育有关的茉莉酸的合成, 反义抑制茉莉酸合成后, 导致雄性不育。繁殖雄性不育材料时, 花期喷施茉莉酸, 使雄性不育材料的育性得到恢复, 从而自交繁殖雄性不育材料, 由于这样的可育材料是后天补充的茉莉酸使育性得到恢复的, 其基因的本质并没有发生改变, 因此, 这样的材料播种后, 下一代仍然不能合成茉莉酸, 仍然是 100% 雄性不育, 因此, 可以用它作为一代杂种种子生产的母本。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菜薹品种为 ‘油青 49’。大肠杆菌菌株 DH5、农杆菌菌株 EHA105 和植物表达载体 pB II21 由本实验室保存。试验时间为 2005 年 1 月至 2008 年 12 月, 试验地点为广州华南农业大学。

1.2 菜薹花药不开裂基因 *DAD1* 的克隆及序列分析

根据 Ishiguro 等 (2001) 发表的拟南芥 (*A. thaliana*) 及白菜型油菜 (*B. brassica campestris*) 的 *DAD1* 基因序列 (GenBank 登录号分别为 A2g44810 和 AB073401), 参考其中一段保守序列 (700 bp 左右, 从 402 bp 至 1 084 bp) 设计引物。

正向引物 P1: 5'-GAATGGACACGTGGAGCTCAC-3'; 反向引物 P2: 5'-GTCACTCCTCCCGTGGAAACC-3'。

取菜薹叶片, 用 CTAB 法提取基因组 DNA, 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件优化为: 94 1 min,

50 1 min, 72 2 min, 35个循环;然后 72 延伸 10 min。PCR产物回收后,利用 TaKaRa公司的克隆载体 pMD18-T连接 PCR产物,转化大肠杆菌,送 6个阳性克隆测序,将测序结果在 NCBI上进行比对,判断 PCR产物的连接方向。用 BLASTN软件将克隆得到的基因进行相似性比较。

1.3 构建反义 *DAD1F*植物表达载体和菜薹遗传转化

提取反阳性克隆,重组载体经 *Xba* 和 *Sma* 双酶切后,回收纯化的目的片段,将其亚克隆入经过相同酶切的植物双元表达载体 pB II21中,得到反义植物表达载体。

切取苗龄 4~5 d的无菌苗带柄子叶作为外植体,用农杆菌介导进行遗传转化。预培养与共培养基相同,为: MS + 0.2 mg · L⁻¹ NAA + 6 mg · L⁻¹ 6-BA + 4 mg · L⁻¹ AgNO₃ + 0.25 mg · L⁻¹ ABA;脱菌培养基为: MS + 0.2 mg · L⁻¹ NAA + 6 mg · L⁻¹ 6-BA + 4 mg · L⁻¹ AgNO₃ + 0.25 mg · L⁻¹ ABA + 200 mg · L⁻¹ Cb;筛选培养基为: MS + 0.2 mg · L⁻¹ NAA + 6 mg · L⁻¹ 6-BA + 4 mg · L⁻¹ AgNO₃ + 0.25 mg · L⁻¹ ABA + 200 mg · L⁻¹ Cb + 5.0 mg · L⁻¹ Km;生根培养基为: MS + 0.2 mg · L⁻¹ NAA + 0.1 mg · L⁻¹ IAA + 5.0 mg · L⁻¹ Km + 200 mg · L⁻¹ Cef。

1.4 菜薹转化植株的分子检测

pB II21载体中含有 *GUS*基因,因此可扩增 *GUS*来进行转基因植株的检测,扩增的 *GUS*片段为 371 bp。*GUS*片段的引物序列 (von Malek et al., 2002) 为: P3: 5'-ACGTCCTGTAGAAACCCCAACC-3'; P4: 5'-TCCCGCAATAACA TTACGGCGT-3'。

分单株取叶片 3~5 g,采用 CTAB法提取辣椒植株基因组 DNA,用 P3和 P4引物扩增 *GUS*并进行鉴定。

提取 PCR检测为阳性的菜薹植株总 DNA,选用 *Bam*H 限制性内切酶酶切 DNA,酶切 12 h左右,然后电泳,转膜。以 *GUS*为探针,进行 Southern杂交检测。

采用 Trizol法提取 Southern杂交为阳性的植株叶片总 RNA,用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0反转录 PCR试剂盒进行 RT-PCR反应,通过琼脂糖凝胶电泳分析 PCR扩增产物。

1.5 转基因植株的育性鉴定

开花时观测转基因植株的花器形态特征。采集花粉,10%蔗糖 + 100 mg · kg⁻¹硼酸 + 5 mg · kg⁻¹赤霉素 + 1%琼脂为培养基,离体萌发检验花粉的生活力 (刘武林, 1985),统计萌发率。

1.6 转基因植株育性的恢复性试验

转基因植株开花后,去掉已经开放的花,用 500 μmol · L⁻¹茉莉酸甲酯 (溶解在 0.05%水溶性 Tween 20中) 浸泡其余的花蕾 1~2 min。3 d后观察并检测花粉在柱头和培养基上的萌发情况和受精能力。

2 结果与分析

2.1 菜薹的花药不开裂基因片段的克隆及序列分析

扩增出一条均匀的 DNA条带,大小约为 700 bp (图 1),与设计的预期值一致。回收目的条带,连接转化和双酶切鉴定后,选取 6个转化子测序。

测序结果表明:重组质粒中插入的外源片段大小为 678 bp。将测序结果在 NCBI上进行比对,与拟南芥和白菜型油菜的 *DAD1F*高度同源,同源率分别为 88%和 99%,说明扩增出的条带就是菜薹的 *DAD1*片段 (*DAD1F*),命名为 *BcpDAD1F*。

根据所得的碱基序列推导其氨基酸序列,与拟南芥 *DAD1*基因的氨基酸序列进行比较发现:菜薹的 *DAD1F*中,存在脂肪酶的特征片段 GHSLG (83~87)的基序,以及催化中心三元组 (catalytic triad) 丝氨酸 (S85)、天冬氨酸 (D142) 和组氨酸 (H208或 H215) 残基。说明菜薹也存在磷脂酶

FLA1, 克隆的 *DAD1F* 包括了该酶的特征片段及脂肪酶的催化中心。*DAD1* 基因催化磷脂转化为亚麻酸是茉莉酸生物合成的最初步骤。序列比对表明该基因比较保守, 变异程度很小, 说明茉莉酸合成作为一种植物较保守的代谢途径, 在这些不同的十字花科植物中具有高度的一致性, 这些植物的茉莉酸代谢关键酶的表达高度一致。

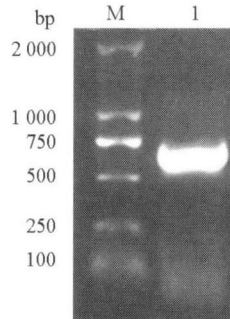


图 1 *DAD1F* 的 PCR 扩增

Fig 1 Amplified *DAD1* fragment by PCR

M. DL2000; 1. *B. rapa* *DAD1F*

2.2 构建反义 *DAD1F* 植物表达载体和菜薹遗传转化

获得的重组子经过酶切得到了约 700 bp 的目的片段, 经测序, 证明 *B. rapa* *DAD1F* 正向和反向均已插入 pB II21 中, 构建的反义 *DAD1F* 植物表达载体 pB I-ant*B. rapa* *DAD1F*, 可以用于植物遗传转化。

试验共得到卡那霉素抗性植株 42 株, 将转化植株与非转化植株移栽到大棚内种植, 观察、检测。

2.3 菜薹转化植株的分子检测

以质粒 DNA 为阳性对照, 未转化的再生植株叶片 DNA 为阴性对照, 用 P3 和 P4 引物扩增 *GUS* 对转化植株进行 PCR 鉴定。阴性对照无扩增产物; 转化植株未扩出与阳性对照大小一样的扩增条带, 为假阳性; 扩出了与阳性对照 (质粒) 大小一样的扩增条带的转化植株为阳性植株 (图 2)。初步确定反义 *B. rapa* *DAD1F* 基因转化菜薹获得成功, 反义 *B. rapa* *DAD1F* 基因已整合进菜薹基因组, 得到菜薹转基因植株 12 株。

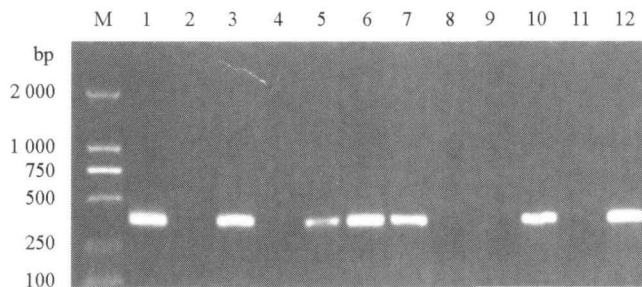


图 2 转基因菜薹的 *GUS* 基因 PCR 扩增检测

M. DL2000; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3、5、6、7、10、12 阳性植株;
2、4、8、9、11. 阴性植株。

Fig 2 PCR analysis of *GUS* gene in the transgenic *Brassica campestris L. ssp. chinensis var. utilis* Tsen et Lee

M. DL2000; 1. Positive control (plasmid PCR); 2. Negative control (control plant); 3, 5, 6, 7, 10, 12. Positive plants;
2, 4, 8, 9, 11. Negative plants

以 *GUS* 片段为探针进行 Southern 杂交，经 PCR 扩增呈阳性的植株，Southern 杂交皆为阳性植株（图 3）。说明外源基因的 DNA 片段已整合到菜薹的基因组中，试验共得到菜薹转反义 *BrcpDAD1F* 植株 12 株，但不同转基因植株目的基因的拷贝数不同，有些只有 1 拷贝（如第 1、2、5、8、9 号转基因植株），多的为 4 拷贝（如第 3、6 号转基因植株）。

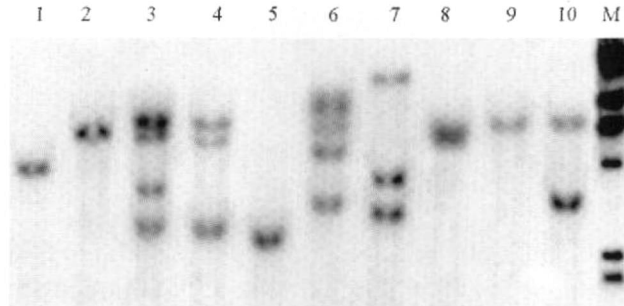


图 3 Southern 杂交

M. DL2000; 1~10. 转基因植株。

Fig. 3 Southern blotting of transgenic plants

M. DL2000; 1 - 10. Transgenic plants

RT-PCR 扩增见图 4，结果表明：有 6 株转基因植株未扩增出目的带，证明外源基因在转录水平未得到表达；6 株扩增出了与阳性对照相同大小的目的带，证明插入的反义 *BrcpDAD1F* 外源基因在转录水平上得到了表达，可用于转基因植株的育性检测。

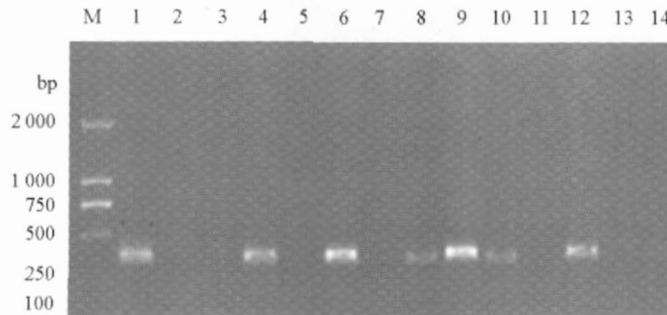


图 4 转基因植株的 RT-PCR 检测

M. DL2000; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~14. 转基因植株。

Fig. 4 RT-PCR analysis of transgenic plants

M. DL2000; 1. Positive control; 2. Negative control;

3 - 14. Transgenic plants

2.4 转基因植株的育性检测

外源基因在转录水平上得到表达的 6 株转基因菜薹，移栽后生长正常，可正常开花，但是花器官都发育异常，有不同类型的畸形发育（图 5，b~i），表现特征有花多瓣、花瓣退化、柱头异常、雄蕊退化、花药萎缩等。对照植株花粉粒大小均匀一致，个体饱满，花粉萌发率可达 85% 以上；而转基因菜薹花药退化，或有花药但无花粉，或有花粉但发育不完全（花粉大小不一，部分花粉为干瘪状，花粉活力低，花粉基本不萌发或萌发很少，萌发率低于 10%）。育性与导入的目的基因拷贝数没有关系。

转基因植株花朵凋谢之后,有4株不能结角果或结空角果,不能产生种子,表现为不育(图5, j)。子房基本无膨大现象,只有极少数的子房膨大,膨大后的荚中并无种子(图5, k)或只有1粒种子(图5, l),其成熟后外观与正常种子无明显差别(图5, o),但播种后种子不能萌发。其可能原因:一是茉莉酸的合成代谢影响了种子的生理生化从而影响了种子的活性;二是种子后熟不充分。对转基因植株种子的活力值得进一步研究。

有2株转基因菜薹在花朵凋谢后,子房膨大,也可形成角果,但膨大的角果仅仅是对照的1/5左右就停止生长,表现畸形,角果内无种子(图5, k, n)。

用对照的花粉与转基因植株授粉,一周内子房膨大,能够正常结荚并产生种子(图5, p)。说明转基因植株的柱头发育正常,能够正常受精,而自身的花粉不能使其受精,花粉败育,表现为雄性不育。

T₁代可育株与不育株的比例都呈1:3的分离,T₂代不同株系的育性分离比例不同,有些株系继续呈1:3分离,有些株系全是可育株或全是不育株,说明反义抑制呈单基因稳定遗传。

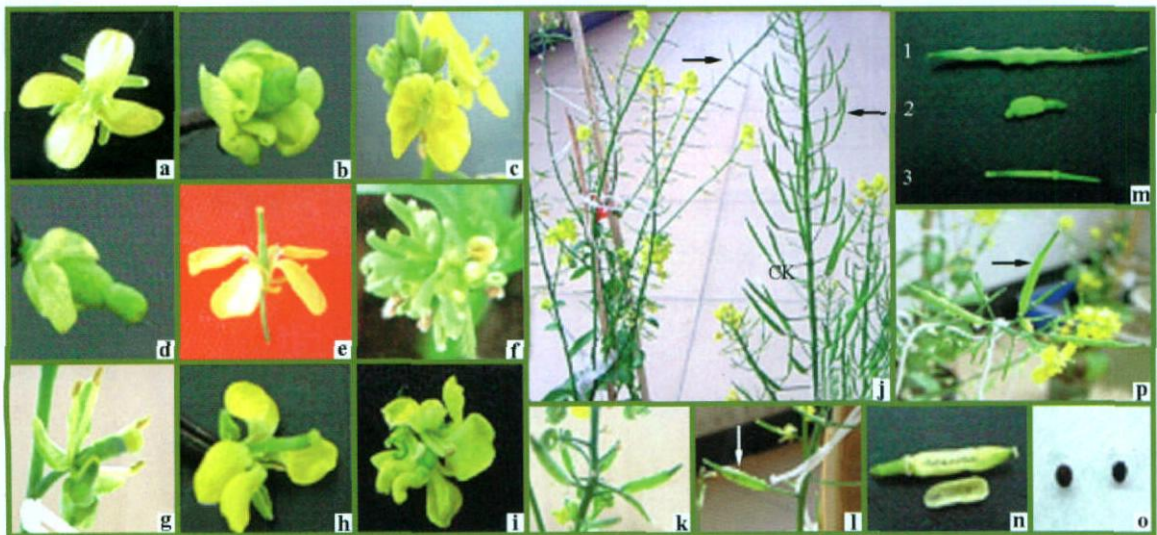


图5 不同类型的畸形花器官及转基因植株结荚情况

- a 正常花; b~i 畸形花; j 转基因植物(左)和非转基因植株(右); k 空荚;
 l 荚中含有一粒种子; m. 非转基因植株(1. 正常荚; 2. 膨大的空荚;
 3. 未膨大的荚); n 成熟后的转基因荚(空无种子);
 o 转基因植株种子(左)和非转基因植株种子(右);
 p. 授粉后的转基因植株。

Fig 5 Flower phenotypes abnormality and siliqua phenotypes for a few transgenic plants
 a Normal flower; b - i Abnormal flower; j Transgenic plant (left) and wild type plant (right);
 k Empty pod; l One seed in the pod; m. Wild type (1. Plant pod; 2. Enlarged
 empty pod; 3. Unenlarged pod); n Mature pod of transgenic plant (no seed);
 o The seed of transgenic plant (left) and wild type plant (right);
 p. Transgenic plant pollinated by wild type plant pollen

2.5 雄性不育转基因植株的育性恢复

对转基因雄性不育菜薹开花期的花蕾用 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯处理 1~2 min, 3 d后检测,发现雄性不育株的花粉在柱头和培养基上均能正常萌发,用此花粉授粉,能够正常结籽。

3 讨论

3.1 茉莉酸代谢与植物育性的关系

茉莉酸的生物合成始于亚麻酸，磷脂在磷脂酶的催化下产生亚麻酸，在脂氧合酶 LOX作用下亚麻酸转化为 13-氢过氧化亚麻酸，后者在丙二烯氧化物合酶 AOS (vonMalek et al, 2002) 以及后继的丙二烯氧化物环化酶 AOC (Zimmeman & Feng, 1978) 作用下形成 12-氧代植二烯酸，再经过还原以及三步氧化产生茉莉酸，然后由它衍生出各种茉莉酸盐。这个代谢链中多个环节的突变都发现了对应的雄性不育，并且这些突变均有通过施加外源茉莉酸恢复育性的共同特点。

本试验得到的转反义 *B_{ncp}DAD1F*菜薹表现为雄性不育，花粉萌发率低，不能结荚，偶尔结荚产生的种子也不能正常萌发。转入菜薹中的反义 *B_{ncp}DAD1F*有效地沉默了 *DAD1*基因的表达，干扰了茉莉酸的生理代谢，影响了花粉的发育，最终导致转基因植株的雄性不育。

Ishiguro等 (2001) 报道，拟南芥 *dad1*突变体的花器官与野生型相比较无明显差异，开花时花药不开裂，不能释放花粉，花粉无活力。他提出了由 *DAD1*基因控制的花药开裂模型。在花药成熟中期的末期，*DAD1*基因在花丝的上部表达，产生 JA。JA 在这个区域可诱导细胞水分的吸收，促进水分从小室通过花药壁（药室内壁和药隔）到花丝运输。小室的干燥通过某些不清楚的机制促进花粉粒的成熟。在晚期花丝的顶部和基部细胞都有 *DAD1*基因的表达，产生 JA，向花药壁和花梗输送水分使花丝延长花药开裂。花丝中的 JA（或 MeJA）通过水分运送到花瓣，促进花瓣细胞水份的吸收，花瓣延长并且开花。

本试验中所得的转基因植株，花药是开裂的，可以散粉，但花粉活力极低，大部分不萌发。分析其中差异的原因，主要有以下几点。首先，在验证拟南芥 *DAD1*基因功能时，使用的是 *DAD1*基因自己的特异启动子，使该基因在花丝中特异表达，而本试验中采用组成型启动子 CaMV 35S，可能在干扰 *DAD1*基因的同时，也影响了与 *DAD1*基因高度同源的其他基因的表达。其次，不同的植物在基因的表达上可能存在一定的差别。茉莉酸的合成代谢是个复杂的生理生化过程，多种因素可影响其代谢，细微的差别就可能引起不同的结果。本试验结果表明菜薹 *DAD1*基因与花粉发育相关，反义 *DAD1*片段可使花粉败育，外施茉莉酸可使其育性得到恢复。

3.2 反义技术与雄性不育

通过反义 RNA 技术干扰基因表达是一种非常成熟的阻断基因正常功能的技术，这一技术不仅成功应用于番茄耐贮基因工程，而且由于其对基因干扰的广泛性而成为反向遗传学研究的重要工具之一。反义干扰花药特异黄酮合成酶类基因表达，成功获得了矮牵牛雄性不育材料 (van der Meer & Stam, 1992)。黄科 (2004) 将与白菜核雄性不育相关的编码细胞色素 P450 的 *CYP86M F*基因中约 460 bp 的片段反向导入正常可育青花菜和芥蓝，得到雄性不育材料。反义表达 *B_{dM}F9*基因，同样在菜薹中获得雄性不育株 (叶意群, 2006)。但以上所得材料的不育率和不育度均没有达到 100%。

本试验利用反义技术干扰 *DAD1*基因表达，阻断茉莉酸的合成，从而获得菜薹雄性不育材料，其不育率和不育度均达 99% 以上，达到了理想的效果，对其它生长发育没有负面影响，可以用于杂种种子生产。反义片段是根据拟南芥 *DAD1*基因保守序列设计的，序列比对表明，克隆的 *DAD1*基因片段包含其具有脂肪酶催化活性中心三元组的氨基酸序列，利用该片段阻断基因的表达，得到了很好的沉默效果，说明该片段是理想的靶基因。同时用同种蔬菜上克隆的片段进行转化，降低基因变异对基因沉默的影响，也是取得较好反义效果的一个因素。

3.3 目的基因拷贝数与基因表达

目的基因导入菜薹基因组是随即整合的，拷贝数多，说明在多个位点整合了目的基因。一般来说，单拷贝整合不会产生共抑制现象，多拷贝整合容易产生共抑制。但本试验中，并没有出现多拷贝

影响反义抑制效果, 无论是多少拷贝, 不育率和不育度都很高。其原因可能是拷贝数主要是影响超表达基因的表达效果, 对反义基因抑制效果可能没有显著影响, 由于本研究中导入的基因是反义基因, 所以拷贝数与反义抑制效果没有明显相关性。

References

- Huang Ke 2004. Creation of artificial male sterile plant in broccoli (*B rassicca oleracea* var *Italica*) and Chinese Kale (*B. oleracea* var *albor-glabra*) by anti-sense gene *CYP86MF* transformation [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 黄 科. 2004. 利用 *CYP86MF* 反义基因转化创建青花菜与芥蓝雄性不育植株的研究 [博士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K 2001. The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *A rabidopsis* Plant Cell, 13: 2191 - 2209.
- Liu Wu-lin 1985. Collection, storage of pollen and its vigour determination Chinese Bulletin of Botany, 3 (3): 8-12. (in Chinese)
- 刘武林. 1985. 花粉的采集、贮藏和生活力的测定. 植物学通报, 3 (3): 8-12.
- Mandaokar A, Kumar V D, Amway M, Browse J. 2003. Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development Plant Mol Biol, 52: 775 - 786
- McConn M, Browe J. 1996. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *A rabidopsis* mutant Plant Cell, 8: 403-416
- van der Meer IM, Stan M E 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. Plant Cell, 4 (3): 253-262
- von Malek B, van der Graaff E, Schneitz K, Keller B. 2002. The *A rabidopsis* male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENA OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. Planta, 216: 187 - 192
- Ye Yi-qun 2006. Functional confirmation of a polygalacturonase gene *B dMF9* in Chinese cabbage (*B rassicca campestris* L. sp. *chinensis* Makino) [M. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 叶意群. 2006. 白菜多聚半乳糖醛酸酶基因 *B dMF9* 的功能分析 [硕士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Zimmeman D C, Feng P. 1978. Characterization of prostaglandin-like metabolite of linolenic acid production by a flaxseed extract Lipids, 13: 313 - 316

图书推荐

《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编, 已于 2002 年 9 月出版发行。

全书分上、下卷, 1~6 章为上卷, 包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类, 计 2 263 个品种, 1 347 页; 7~12 章为下卷, 包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类, 计 2 550 个品种, 1 177 页。

入志的品种中, 地方品种占 90% 以上, 少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。

本书较全面系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源概貌、研究成果及育种水平, 可供蔬菜科研、教学、生产及种子公司、农业行政单位的人员参考。

本书出版后受到读者普遍好评, 现尚有少量存书, 特以优惠价格 490 元 (上、下卷) 提供给读者 (原价 980 元)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所 《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。