

中间锦鸡儿 *FAD2* 基因拷贝数检测 及组织表达谱分析

林 萍^a, 汪阳东^a, 齐力旺^b, 张守攻^b

(中国林业科学研究院 a 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; b 林业研究所, 北京 100091)

[摘要] **【目的】**探索中间锦鸡儿基因组中 *FAD2* 基因的拷贝数, 分析不同拷贝的表达模式, 以期揭示不同拷贝在植物体内的功能分工。**【方法】**根据中间锦鸡儿(*Caragana intermedia*) *FAD2* 基因的保守序列设计 1 对引物 SF 和 SR, 利用该引物对 PCR 扩增制备 114 bp 的 Southern 检测探针, 探针进行地高辛标记后, 采用罗氏 Southern 杂交试剂盒进行 Southern 检测。根据中间锦鸡儿 3 个 *FAD2* 基因各自的特异差异序列, 分别设计定量 PCR 引物序列, 以 *actin* 基因为内参, 对中间锦鸡儿的根、茎、叶及不同发育时期(发芽 15, 25, 35 d)种子的 cDNA 进行定量 PCR 分析。**【结果】**中间锦鸡儿 *FAD2* 基因至少有 4 个拷贝, 且不同拷贝的表达模式不同。*FAD2-2A* 基因在根和发育中期、后期的种子中低水平表达, 在幼嫩的茎、叶以及发育早期的种子中高水平表达; *FAD2-1A* 基因在根中的表达量最低, 在种子发育早期、中期大量表达, 在幼嫩叶子中表达水平也较高; *FAD2-1B* 基因仅在种子发育中期大量表达, 在其他组织及种子其他发育阶段的表达量均保持在本底水平。在不同组织以及种子的不同发育时期, *FAD2-1A* 相对表达量的变化幅度最大, 达到了近 100 倍, *FAD2-1B* 次之, *FAD2-2A* 最小。**【结论】**结合序列比对分析推测: *FAD2-2A* 基因可能主要负责合成膜脂中的亚油酸, *FAD2-1A* 主要负责种子及叶子贮脂中亚油酸的合成, *FAD2-1B* 负责种子贮脂中油酸的去饱和作用。

[关键词] 中间锦鸡儿; *FAD2* 基因; 实时定量 PCR; 表达谱

[中图分类号] Q786; S793.301

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)01-0119-06

Copy detection and expression profile analysis of *FAD2* genes in *Caragana intermedia*

LIN Ping^a, WANG Yang-dong^a, QI Li-wang^b, ZHANG Shou-gong^b

(a Research Institute of Subtropical Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China;

b Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: **【Objective】**The study was to detect the *FAD2* gene copies, analyze the *FAD2* gene expression profile and presume every copy's function in *Caragana intermedia*. **【Method】**The Southern-blotting probe was prepared by PCR with the primers designed according to the consensus sequence of *FAD2* genes in *C. intermedia*. The probe was labeled by digoxin and Southern-blotting was done with Roche Southern-blotting kit. The real-time PCR primers were designed according to the distinct sequences of every *FAD2* copy. The quantity PCR was done for root, stem, leaves and the young seed of *C. intermedia* with the actin gene as interior control. **【Result】**Southern-blotting results indicated there were four copies of *FAD2* gene in *C. intermedia* genome at least, and these were coincident with the four *FAD2* genes cloned. The real-time PCR was performed to detect the relative expression levels of *FAD2-2A*, *FAD2-1A* and *FAD2-1B*

* [收稿日期] 2009-05-08

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑专题(2006BAD01A1606)

[作者简介] 林 萍(1980—), 女, 山东烟台人, 助理研究员, 博士, 主要从事林木遗传育种研究。E-mail: linping80@126.com

[通信作者] 张守攻(1949—), 男, 安徽淮南人, 研究员, 中国林业科学研究院首席科学家, 博士生导师, 主要从事林木遗传育种研究。E-mail: shougong.zhang@caf.ac.cn

mRNA. *FAD2-2A* transcript showed a low level in the root, middle-stage seeds and pre-mature seeds, and *FAD2-2A* was expressed more in the first-stage seeds and tender leaves than in the other tissues. *FAD2-1A* transcripts showed the lowest level in the root and the highest level in the first-stage and middle-stage seeds, and it was expressed abundantly in the tender leaves, too. *FAD2-1B* was expressed abundantly in the middle-stage seeds and its transcript was very low in the other tissues. In all tissues the *FAD2-1A* transcript level changed most, and that of *FAD2-2A* changed least. 【Conclusion】 According to all of these, we deduced that *FAD2-2A* takes responsibility for desaturating oleic acid in the membrane lipid mainly; *FAD2-1A* is in charge of desaturating oleic acid in the store lipid of seeds and leaves; and *FAD2-1B* is in charge of desaturating oleic acid in the store lipid of seeds, too.

Key words: *Caragana intermedia*; *FAD2* gene; Real-time PCR; expression profile

$\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶($\Delta 12$ fatty acid desaturase, $\Delta 12$ FAD, 也称为 *FAD2*)催化油酸生成亚油酸, 是植物体内生成多不饱和脂肪酸的关键酶^[1-3]。编码该酶的 *FAD2* 基因已经从多种植物中克隆到, 在植物中一般有多个拷贝, 不同拷贝间在序列特征、表达调控和功能等方面存在显著差异^[4-5], 如向日葵的基因组中存在 3 个 *FAD2* 基因拷贝, 其中 1 个特异地种子中高表达, 而另外 2 个在不同组织中均有表达; Martinez-Rivas 等^[6]认为, 前者可能控制贮脂饱和, 与种子油酸含量直接相关, 而后两者与膜脂饱和和有关。Mikkilineni 等^[7]研究表明, 在玉米植株中存在 3 个 *FAD2* 功能基因, 其中 2 个在胚中表达, 另 1 个在其他组织中表达; Northern 杂交发现, 胚中的 *FAD2* 基因在授粉后 14 d 表达量最高。在大豆、甘蓝型油菜和橄榄等的基因组中, 也发现不同 *FAD2* 基因拷贝具有不同的表达模式^[8-12]。

中间锦鸡儿(*Caragana intermedia*)为豆科锦鸡儿属落叶灌木, 广泛分布于我国黄河流域以北的干燥地区, 其抗干旱、耐盐碱, 是沙漠、半沙漠地区重要的防风固沙树种。锦鸡儿属植物茎叶中富含营养, 种子产量大, 是牲畜的好饲料, 但除牲畜采食外, 尚未对其进行深度的开发利用。为了对中间锦鸡儿种子油脂成分进行改良, 进一步提升中间锦鸡儿的经济价值, 本课题组对其 *FAD2* 基因进行了初步研究, 已经克隆到序列、编码蛋白性质等各不相同的 4 个 *FAD2* 基因(*FAD2-2A*、*FAD2-2B*、*FAD2-1A* 和 *FAD2-1B*)^[13], 并进行了简单的比较分析^[14]。本研究将进一步采用 Southern 杂交技术, 探索中间锦鸡儿基因组中 *FAD2* 基因的拷贝数, 采用定量 PCR 技术分析基因不同拷贝的表达模式, 以期揭示其中 3 个基因(*FAD2-2B* 基因的组织表达分析, 已由本实验室汪阳东博士进行研究)在植物体内的功能分工, 为将来的中间锦鸡儿基因工程改良提供更

精确的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 中间锦鸡儿的幼嫩根、茎、叶及不同发育时期的种子(授粉后 15, 25 和 35 d), 均采自中国林业科学研究院玉泉山苗圃 4 年生实生苗。

1.1.2 主要试剂 地高辛标记 Southern 检测试剂盒, 购自 Roche; 限制性内切酶 *Fok* I、*Hae* III、*Rsa* I, 购自 Promega; Trizol RNA 提取试剂盒, 购自 invitrogen; 未成熟种子 RNA 提取试剂盒, 购自北京奥莱博生物技术有限责任公司; M-MLV 反转录酶, 购自 Promega; SYBR® *Premix Ex Taq*™ 实时定量试剂盒, 购自 TaKaRa; 所有引物均由上海生物工程技术有限公司合成。定量 PCR 在 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 系统上进行。

1.2 方法

1.2.1 中间锦鸡儿基因组 DNA 的 Southern 检测

(1) 探针制备。根据 4 个 *FAD2* 基因的保守序列设计上、下游引物 SF: 5'-TGGCCTACCTACTGG-GCTAT-3' 和 SR: 5'-AACAAGATCATCAAGCC-ATTG-3', 以中间锦鸡儿基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将获得的 PCR 产物回收、测序, 该片段长 114 bp, 作为 Southern 检测的探针。(2) Southern 杂交。利用改良 CTAB 法提取中间锦鸡儿基因组 DNA, 将基因组 DNA 进行限制性酶切, 从 *Eco*R I、*Sac* I、*Bam*H I、*Xba* I、*Apa* I、*Pst* I、*Hinc* II、*Fok* I、*Hae* III、*Rsa* I、*Cla* I 等 11 种限制性内切酶中, 筛选能够将基因组 DNA 酶切充分、形成均匀弥散条带的内切酶。50 μ L 酶切体系为: DNA 样品 25 μ L, 限制性内切酶 3.5 μ L, 10 $\times$ Buffer 5 μ L, BSA 1 μ L, 无菌水 15.5 μ L。混匀, 略微离心, 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜; 酶切完全后的样品于 10 g/L 琼

脂糖凝胶中以25~30 V 稳压电泳 12~16 h,使不同长度的 DNA 片段在凝胶中较好地分开;采用毛细管法转膜,后续的杂交显影等步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 中间锦鸡儿 3 个 *FAD2* 基因的荧光定量 PCR 中间锦鸡儿未成熟种子及根、茎、叶总 RNA 的提取分别按照试剂盒说明书进行;单链 cDNA 按照 SMART 策略合成。根据 *FAD2-2A*、*FAD2-1A* 和 *FAD2-1B* 3 个基因各自的特异序列,设计定量 PCR 引物序列如下:

FAD2-2AF: 5'-CGCCCTCTCTCTTTCTTGGC-3',*FAD2-2AR*:5'-CTGGATACCGGTCTTCTTCT-3',PCR 产物 260 bp;*FAD2-1AF*:5'-GTGTTTCATCACATAACTGA-3',*FAD2-1AR*:5'-ATCATCATCCATGCTTTTCT-3',PCR 产物 256 bp; *FAD2-1BF*: 5'-CTCCCATATATTCTGATAGG-3',*FAD2-1BR*:5'-CTCCCCTGAGCCAATCTCATTC-3',PCR 产物 237 bp。

选择中间锦鸡儿表达量稳定的 *actin* 基因作为内参,设计扩增引物:*actF*:5'-GAGGCTCCACTCAACCCA-3',*actR*:5'-CAGCGAGATCCAAACGAA-3';2 个引物扩增片段长度均为 226 bp。定量 PCR 的具体操作过程按照 SYBR® *Premix Ex Taq*™ 实时定量试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 中间锦鸡儿基因组 DNA 的 Southern 检测

通过筛选,从 11 个限制性内切酶中,确定了能

够对基因组 DNA 充分酶切的 3 个内切酶:*Fok* I、*Hae*Ⅲ和 *Rsa* I。由图 1 可知,在 *Rsa* I 和 *Fok* I 酶切 DNA 上各杂交出 1 条带,在 *Hae*Ⅲ酶切 DNA 上杂交出 4 条带。由于已经从中间锦鸡儿 cDNA 中克隆了 4 个 *FAD2* 基因,而且在探针 66 bp 处有一个 *Hae*Ⅲ酶切位点,因此从理论上讲,在 *Hae*Ⅲ酶切 DNA 上至少应该杂交出 5 条带。这可能是由于杂交过程中背景过强,掩盖了部分杂交信号。

2.2 中间锦鸡儿 3 个 *FAD2* 基因的荧光定量 PCR

FAD2-2A、*FAD2-1A* 及 *FAD2-1B* 的融解曲线(图 2)显示,在定量 PCR 过程中,3 个基因均被特异性扩增,说明定量 PCR 结果能够代表 3 个基因在不同组织及种子不同发育时期的表达情况。

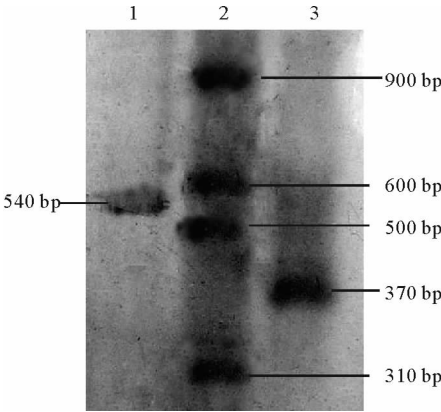


图 1 中间锦鸡儿基因组 DNA 的 Southern 杂交

1. *Rsa* I ;2. *Hae*Ⅲ;3. *Fok* I

Fig. 1 Southern-blotting of genome DNA of *C. intermedia*

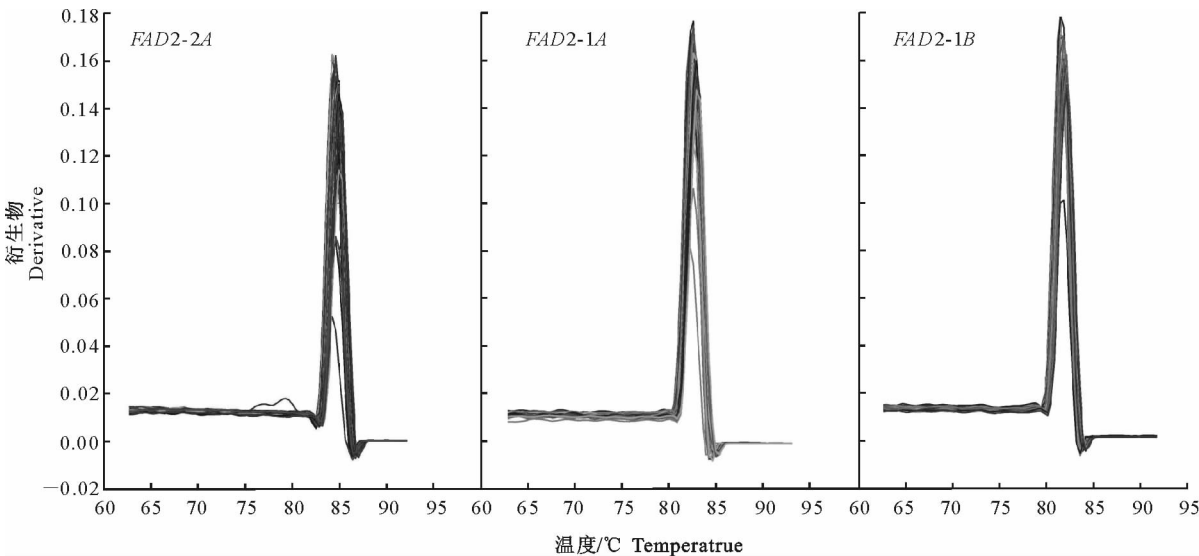


图 2 中间锦鸡儿 *FAD2-2A*、*FAD2-1A* 和 *FAD2-1B* 基因的融解曲线

Fig. 2 Dissociation curves of *FAD2-2A*,*FAD2-1A* and *FAD2-1B* of *C. intermedia*

Real-time PCR 结果(图 3)表明,*FAD2-2A* 在根、茎、叶以及发育 15,25 和 35 d 的种子中均有表达,且在发育 15 d 种子中的表达量最高,在茎中的表达量次之,在发育 35 d 的种子中表达量最低。以根中的表达量作为标准基数 1,在 35 d 种子中的相对表达量只有 0.03,在 15 d 种子中的相对表达量则高达 17.11。

FAD2-1A 在不同组织以及种子的不同发育时期也均有表达,但在种子发育早期(15 d)和中期(25 d)的表达量远远高于种子发育后期以及在根、茎、叶等

营养器官中的表达量。以根中的表达量作为标准基数 1,发育 15 d 种子中的相对表达量达到了 58.73,发育 25 d 种子中的相对表达量达到了 94.95。

FAD2-1B 在不同组织以及种子的不同发育时期也均有表达,但在发育中期种子中的表达量明显高于其他组织及种子的其他发育时期。以根中的表达量作为标准基数 1,在发育 25 d 种子中的相对表达量为 22.90,在发育 15 d 种子中的相对表达量最低,只有 0.55,在其他组织中的相对表达量也仅有 1~3。

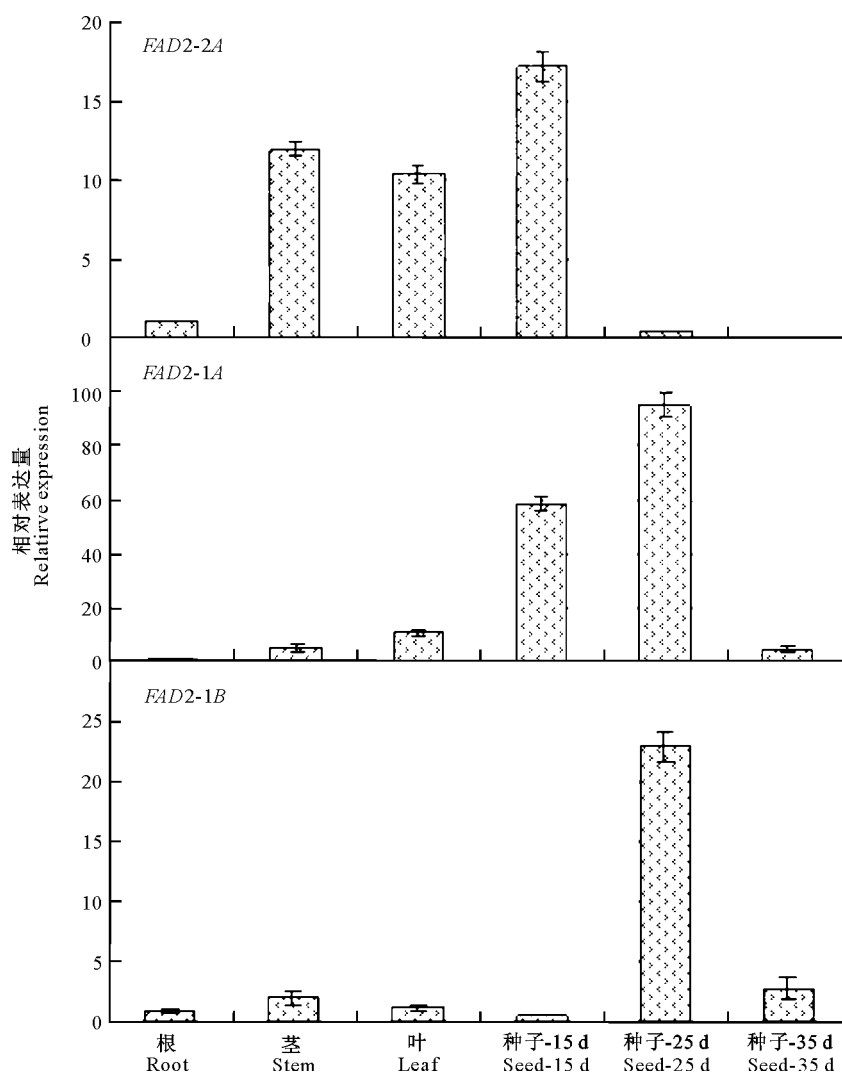


图 3 中间锦鸡儿 *FAD2-2A*、*FAD2-1A* 和 *FAD2-1B* 基因在根、茎、叶及种子不同发育时期的表达分析

Fig. 3 Expression profile of *FAD2-2A*, *FAD2-1A* and *FAD2-1B* in root, stem, leaves and young seeds of *C. intermedia*

3 讨论

3.1 *FAD2* 基因的 Southern 检测

在本研究的 Southern 杂交结果中,*Hae* III 酶切 DNA 上杂交出 4 条带。研究证明,*FAD2* 基因除在拟南芥等少数植物中只有 1 个拷贝外,在多数植物

中均有多个拷贝,如棉花^[15]、玉米^[7]中有 3 个以上,大豆^[8,16-17]中已经分离到 4 个,油橄榄^[10]中也分离到 2 个。

3.2 *FAD2* 基因的表达谱分析

在各种植物中,*FAD2* 基因的多拷贝之间功能不同。例如,大豆中的 4 个拷贝有 2 个在种子中特

异性表达,负责种子贮脂中油酸去饱和生成亚油酸;另2个为组成型表达,推测其功能是负责植物膜脂中亚油酸的合成^[8,16-17]。油橄榄中的 *FAD2-1* 可能是负责幼嫩种子中贮脂的去饱和作用,*FAD2-2* 则可能主要负责成熟种子和中果皮贮脂的去饱和作用^[10]。据此推测,中间锦鸡儿的3个 *FAD2* 基因的分工可能也各不相同。

本研究中,中间锦鸡儿 *FAD2-2A* 基因在根中低水平表达,在幼嫩的茎、叶以及发育早期种子中高水平表达,相对表达量均达到根中表达量的10倍以上,这可能与这些器官活跃的细胞分裂有关;而在主要进行贮脂及其他营养物质合成的种子发育中期,及种子发育基本完成且各种生命活动较弱的种子发育后期,*FAD2-2A* 的表达量非常低。结合该基因的序列比对分析推断:*FAD2-2A* 基因可能主要负责合成膜脂中的多不饱和脂肪酸亚油酸。

FAD2-1A 基因在根中的表达水平最低,在叶中的相对表达量是根中表达量的10倍以上,在15 d种子中的相对表达量为根中表达量的58.73倍,而在25 d种子中的相对表达量接近根中表达量的100倍。可见,*FAD2-1A* 在种子发育早期和中期大量表达,在幼嫩叶子中表达量也较高。由于锦鸡儿属植物不仅在种子中含有大量油脂,茎叶中也含有油脂,因此推测 *FAD2-1A* 主要负责中间锦鸡儿种子及叶子中贮脂的合成。

FAD2-1B 基因仅在种子发育中期大量表达,在其余组织及种子的其他发育阶段的相对表达量都保持在本底水平,推测该基因也主要与种子贮脂中油酸的去饱和作用有关。

在中间锦鸡儿各组织以及种子的不同发育时期,都以根中的表达量作为基数1,*FAD2-2A* 的最高表达量为17.11,而 *FAD2-1A* 的最高表达量达到了94.95,*FAD2-1B* 的表达量也有22.90,可见,*FAD2-1A* 表达量的变化幅度最大,*FAD2-1B* 次之,*FAD2-2A* 的最小。这可能与其分工不同有关:*FAD2-2A* 主要负责膜脂去饱和,因此各时期表达比较平稳,表达量变化不大;而 *FAD2-1A* 和 *FAD2-1B* 主要负责种子贮脂的去饱和,由于种子贮脂含量较高,使得这2个基因在种子发育时期的表达量大幅度上升。

大豆、向日葵、玉米等都有只在种子中特异表达的 *FAD2* 基因,而中间锦鸡儿的3个 *FAD2* 基因在各个组织中都表达,并且通过表达水平的高低调控不同拷贝的分工。因此,在通过基因工程等手段进

行中间锦鸡儿油脂成分改良时,要根据不同的改良目的,有针对性地对关键基因进行改良。

4 结 论

中间锦鸡儿 *FAD2* 基因至少有4个拷贝,且不同拷贝的表达模式不同。*FAD2-2A* 基因在根和发育中期、后期的种子中低水平表达,在幼嫩的茎、叶以及发育早期的种子中高水平表达。*FAD2-1A* 基因在根中的表达量最低,在种子发育早期、中期大量表达,在幼嫩叶子中的表达水平也较高。*FAD2-1B* 基因仅在种子发育中期大量表达,在其他组织及种子其他发育阶段的相对表达量都保持在本底水平。在不同组织以及种子的不同发育时期,*FAD2-1A* 相对表达量的变化幅度最大,达到了近100倍,*FAD2-1B* 次之,*FAD2-2A* 的最小。

[参考文献]

- [1] Okuley J, Lightner J, Feldmann K, et al. Rabidopsis *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis [J]. *Plant Cell*, 1996, 6: 147-158.
- [2] Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 957-970.
- [3] Ohlrogge J, Jaworski J G. Regulation of fatty acid synthesis [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 48: 109-136.
- [4] Gustavo B, John O, Mike P. Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with *Arabidopsis epidermis*: occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1, 18-dioate as the major component [J]. *The Plant Journal*, 2004, 40: 920-930.
- [5] 陈喜凤, 祝建波, 张煜新, 等. 大豆微粒体油酸盐脱饱和酶 *FAD2* 基因的克隆及其植物表达载体的构建 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2008, 26(2): 216-219.
Chen X F, Zhu J B, Zhang Y X, et al. Cloning of Glycine max *FAD2* gene and construction of plant expression vector [J]. *Journal of Shihezi University: Natural Science Edition*, 2008, 26(2): 216-219. (in Chinese)
- [6] Martinez-Rivas J M, Sperling P W, Heinz E. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L) [J]. *Mol Breed*, 2001, 8: 159-168.
- [7] Mikkilineni V, Rocheford T R. Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (*fad2*) and fatty acid desaturase-6 (*fad6*) cDNAs in maize [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(7): 1326-1332.
- [8] Heppard E P, Kinney A J, Stecca K L, et al. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal-6 desaturase genes in soybeans [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 311-319.
- [9] Schlueter J A, Vasylenko-Sanders I F, Deshpande S, et al. The

- FAD2* gene family of soybean: Insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome [J]. *Crop Sci*, 2007, 47: 14-26.
- [10] Hernfindez M L, Mancha M, Martinez-Rivas J M. Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (*FAD2*) from olive [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66: 1417-1426.
- [11] Scheffler J A, Sharpe A G, Schmidt H, et al. Desaturase multi-gene families of *Brassica napus* arose through genome duplication [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 583-591.
- [12] 肖 钢, 张宏军, 彭 琪, 等. 甘蓝型油菜油酸脱氢酶基因 (*fad2*) 多个拷贝的发现及分析 [J]. *作物学报*, 2008, 34(9): 1563-1568.
- Xiao G, Zhang H J, Peng Q, et al. Screening and analysis of multiple copy of oleate desaturase gene (*fad2*) in *Brassica napus* [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(9): 1563-1568. (in Chinese)
- [13] 林 萍, 汪阳东, 齐力旺, 等. 中间锦鸡儿 *FAD2* 基因克隆与序列分析 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1): 148-154.
- Lin P, Wang Y D, Qi L W, et al. Clone and sequence analysis of *FAD2* genes from *Caragana intemedia* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6(1): 148-154. (in Chinese)
- [14] 林 萍, 汪阳东, 齐力旺, 等. 中间锦鸡儿 4 个 *FAD2* 蛋白的比较与分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(3): 486-493.
- Lin P, Wang Y D, Qi L W, et al. Comparison and analysis of four *FAD2* proteins in *Caragana intemedia* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 16(3): 486-493. (in Chinese)
- [15] Pirtle I L, Kongcharoensuntorn W, Nampaisansuk M. Molecular cloning and functional expression of the gene for a cotton Delta-12 fatty acid desaturase (*FAD2*) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1522(2): 122-129.
- [16] Tang G Q, Novitzky W P, Griffin H C, et al. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation [J]. *The Plant Journal*, 2005, 44: 433-446.
- [17] Li L, Wang X, Gai J, et al. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(11): 1516-1526.

(上接第 118 页)

- [16] 陈大伦, 张瑞茂. 甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育系 118A 的发现与选育 [J]. *贵州农业科学*, 2006, 34(6): 5-7.
- Chen D L, Zhang R M. Discovery of recessive GMS 118A and its breeding in *Brassica napus* [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2006, 34(6): 5-7. (in Chinese)
- [17] 杨光圣, 瞿 波, 傅廷栋. 三个甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育系小孢子发生的细胞学研究 [J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(6): 520-523.
- Yang G S, Qu B, Fu T D. Cytological study of microsporogenesis in three recessive genic male sterile lines of *Brassica napus* L. [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1999, 18(6): 520-523. (in Chinese)
- [18] 樊云芳, 胡胜武, 董彩华, 等. 一个甘蓝型油菜 DGCMS 雄性不育系的花器形态及细胞学研究 [J]. *中国油料作物学报*, 2006, 28(4): 403-407.
- Fan Y F, Hu S W, Dong C H, et al. Cytological investigation of microsporogenesis in a digenic recessive GMS line of *Brassica napus* [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2006, 28(4): 403-407. (in Chinese)
- [19] Sanders P M, Bui A Q, Weterings K, et al. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants [J]. *Sex Plant Reprod*, 1999, 11(6): 297-322.
- [20] 杨光圣, 瞿 波, 傅廷栋. 甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育系宜 3A 花药发育的解剖学研究 [J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(5): 405-411.
- Yang G S, Qu B, Fu T D. Cytology research on the anther abortion of dominant nucleic male sterile line Yi-3A in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1999, 18(5): 405-411. (in Chinese)
- [21] Mascarenhas J P. The biochemistry of angiosperm pollen development [J]. *Bot Rev*, 1975(4): 259-314.
- [22] Chapman G P. The tapetum [J]. *Int Rev Cytol*, 1987, 107: 111-125.
- [23] Scoles G J, Evans L E. Pollen development in male fertile and cytoplasmic male sterile rye [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1979, 57: 2782-2790.