

TA29-*barnase* 基因转化菜心

曹必好, 孟成民, 雷建军, 陈国菊

华南农业大学园艺生物技术研究所, 华南农业大学蔬菜遗传与品质改良中心, 广州 510642

摘要: 利用根癌农杆菌导入法, 以菜心带柄子叶为外植体, 对 TA29-*barnase* 基因转化菜心进行研究。获得转化植株, 进行 PCR、Southern blotting 杂交和半定量 RT-PCR 检测, 表明目的基因已经整合到转化植株中, 并且目的基因在转基因植株花蕾中得到表达, 但是表达水平在不同转基因植株间存在差别; 转基因植株开花后, 均表现雄性不育, 不能产生花粉或产生没有活力的少量花粉, 自交不能结实; 用未转化植株正常花粉对雄性不育植株进行授粉, 能够正常结实; 保持系(未转化植株)与不育株杂交后代中雄性不育株与可育株的比例为 1:1, 在杂交后代植株子叶期, 喷洒 10 mg/L 的 PPT 可以完全杀死可育株; 利用其他菜心品种为父本与不育株进行杂交, 获得的 F1 植株在生长势和产量方面表现优势, 表明开展菜心优势育种具有一定的潜力。

关键词: 菜心, TA29-*barnase* 基因, 雄性不育

The *pTA29-barnase* Chimeric Gene Transformation of *Brassica campestris* L. subsp. *chinensis* Makino var. *parachinensis* Mediated by *Agrobacterium*

Bihao Cao, Chengmin Meng, Jianjun Lei, and Guoju Chen

Horticulture Biotechnology Research Institute, the Genetic and Quality Improved Center of Vegetable, South-China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: In order to induce male sterility of *Brassica campestris* L. subsp. *chinensis* Makino var. *parachinensis*, we introduced the chimeric *pTA29-barnase* gene into it by *Agrobacterium tumefaciens* transformation. We obtained the transgenic plants, and determined them by PCR, Southern blotting and RT-PCR analysis. Results indicated that the RNase (*barnase*) gene had been transferred into genome of plant, and its expression level was different among transformation plants. All transgenic plants were male sterile; there was no vigor or a little pollen without fertility in the anther of transgenic plants. The transgenic plants failed to produce seeds under the condition self-control pollination, but hybrid seeds set were obtained when these transgenic plants were cross-pollinated artificially with normal pollen from untransformed plants. Progeny from cross-pollinated maintainer line with transgenic plants segregated in the 1:1 for male sterility and male fertility, and these phenotypes corresponded directly to the presence or absence of the chimeric TA29-*barnase* gene. The male fertile plants of co-separated progenies could die by spraying 10 mg/L PPT in cotyledon seedling stage. The hybrid F1 between male sterility and other varieties showed heterosis in yield and growth. All these show that it is an efficient method to induce male sterility in *Brassica campestris* L. subsp. *chinensis* Makino var. *parachinensis* by TA29-*barnase* gene, there is potential on heterosis breeding of *Brassica campestris* L. subsp. *chinensis* Makino var. *parachinensis*.

Keywords: *Brassica campestris* L. subsp. *chinensis* Makino var. *parachinensis*, TA29-*barnase* gene, male sterility

Received: October 23, 2007; **Accepted:** December 29, 2007

Supported by: Guangdong Key Technology Research and Development Program (No. 2002A2070301), and Guangdong Natural Fund (No. 04300505).

Corresponding author: Jianjun Lei. Tel: +86-20-85288262; Fax: +86-20-85282107; E-mail: jjlei@scau.edu.cn

广东省科技攻关(No. 2002A2070301)和广东省自然科学基金项目(No. 04300505)资助。

菜心 (*Brassica campestris* L. subsp. *chinensis* Makino var. *parachinensis* Tsen et Lee) 又名菜薹, 十字花科芸薹属植物, 是华南地区的主要蔬菜之一, 可周年生产供应, 既适合国内市场销售, 又可出口创汇, 是目前广东省栽培面积最大的蔬菜之一。由于目前菜心中尚未找到理想的雄性不育系和自交不亲和系, 故优势育种目前在菜心上应用不多, 现有菜心品种的来源主要来自常规品种的选育。随着现代生物技术研究不断深入, 利用基因工程技术来创造植物新的雄性不育材料提供新的途径。目前开展植物雄性不育基因工程研究中, 研究最多的是利用 *TA29-barnase* 转化植物, 获得新的雄性不育材料。*TA29* 基因是烟草花药绒毡层高度特异表达基因^[1], 用 *TA29* 基因的启动子与 *Barnase* 基因融合构建了 *TA29-barnase* 嵌合基因转化植物, 可以获得人工雄性不育系并应用于杂交育种工作。1990 年和 1992 年, Mariani 获得烟草和油菜雄性不育系与恢复系^[2,3], 此后, 一些学者相继报道了利用该基因转化多种作物的研究, 已分别获得了油菜^[4,12]、烟草^[5]、花椰菜和莴苣^[6]、棉花^[7]、白菜^[8]、甘蓝^[9]、番茄^[10] 等的转基因植株。有报道表明, 由 *TA29-barnase* 嵌合基因转化所得的雄性不育植株在较高温度下会发生育性恢复

现象^[11]。本研究利用 *barnase* 基因转化菜心, 以期获得菜心转基因雄性不育植株, 为利用基因工程开展菜心优势育种作一些探讨。

1 材料与方法

1.1 植物材料

菜心品种: “油青四九”、“柳叶油青菜心”、“油青 80 天” 由广东省农科院蔬菜研究所提供。

1.2 质粒与菌株

农杆菌菌株: *EHA105* (*Agrobacterium tumefaciens*)

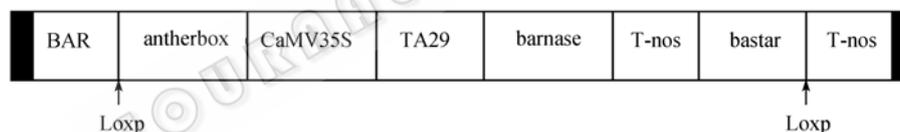
质粒: pCABARTABn^[13], 启动子 *TA29*(*TA29* 基因上游 -291~+12 之间, GenBank Accession No.: X52283), *CaMV35S* 启动子从 pBI121 上用 *EcoR* I 和 *Sma* I 切下, 终止子 *nos*, 载体 T-DNA 区带有筛选基因 *bar*, 能使转基因植株对除草剂产生抗性(筛选标记 PPT)。(由西南大学园艺学院宋洪元老师赠送)。

花药盒(antherbox)序列由上海生工合成为:

5'-GAATTCCACAAAATAAGAGAAGCTT-3'

5'-CTTAAGGTGTTTTTATTCTCTTCGAA-3'

结构如图:



1.3 菜心的遗传转化

以“油青四九”菜心种子表面消毒播种于 1/2MS 培养基获得无菌苗; 切取 4 d 苗龄的无菌苗带柄子叶作为外植体, 在分化培养基 MS+0.6 mg/L NAA+6 mg/L 6-BA+4 mg/L AgNO₃+0.25 mg/L ABA 上预培养 2 d。浸入用 MS 液体培养基悬浮至 OD₆₀₀ = 0.3~0.6 的农杆菌液中感染 10 min, 无菌滤纸吸去残留菌液, 重新接入分化培养基中暗培养 2 d; 转接至含 6.5 mg/L PPT 和 200 mg/L Cb 的抑菌筛选培养基上对获得的不定芽进行多代筛选, 淘汰未转化的白化芽和嵌合体, 得少量具 PPT 抗性的绿色不定芽。

1.4 菜心的 DNA 和 RNA 提取

采用 CTAB 法提取菜心植株 DNA; RNA 的提取按照 RNA 提取试剂盒说明进行。

1.5 转基因植株分子生物学检测

1.5.1 PCR 检测

根据 *barnase* 基因(0.33 kb)设计引物。

上游引物: 5'-GCAGAATTCACCATGGCACAG GTTATCAAC-3'

下游引物: 5'-CCCCTCGGATCCGTTATCTGATCTTTGTA-3'

PCR 反应体系(总体积为 25 μL): 10× PCR buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 模板 30 ng, Taq 酶 2.5 u, ddH₂O 补至总体积为 25 μL; PCR 扩增反应程序: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。扩增完毕后, 在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 凝胶成像系统检测。

1.5.2 转基因菜心 Southern blotting 杂交检测

Southern blotting 杂交按照试剂盒((Boehringer Mannheim))说明进行。用 *EcoRI* 酶切提取的菜心 DNA。

1.5.3 目的基因半定量式 RT-PCR 分析

以菜心中的 *Actin* 基因作为内标, 进行半定量式 RT-PCR 分析。

1.6 转基因雄性不育植株不育性状分析

1.6.1 花粉 TTC 染色

利用 1% TTC 浸泡花粉 30 min, 比较对照与转基因植株的花粉染色情况, 统计花粉活力。

1.6.2 花粉发芽率检测

花粉萌发实验采用固体悬滴培养法, 基本培养基为: 10%蔗糖+1%琼脂+0.01%硼酸。把培养基滴于凹玻片上然后小心把花粉均匀播撒于培养基上。再置于培养皿(培养基中铺一层湿纱布以保持一定湿度)中 26°C 恒温培养 2 h 后, 显微镜(Olympus BH-2, 日本)下镜检花粉萌发情况, 并拍照。

1.6.3 转基因植株花器官的观察

按照常规方法调查对照与转基因植株花器官的发育情况, 比较有无差异。

1.7 转基因菜心植株后代雄性不育遗传与抗 PPT 分析

以获得的转基因雄性不育植株为母本, 未转植株(对照)为父本进行杂交, 收获种子, 播种后, 调查后代植株中目的基因的分离情况, 以及后代中含有目的基因植株的不育性状的稳定性。同时对后代分离群体喷洒。

1.8 转基因菜心雄性不育植株配制组合杂交优势分析

利用“柳叶油青菜心”、“油青 80 天”为父本, 以不育性状稳定的雄性不育株为母本进行杂交, 调查结籽情况, 比较 F1 代植株与父母本的生长情况, 调查产量。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的获得与分子生物学鉴定

2.1.1 转化植株的获得

“油青四九”菜心种子表面消毒播种于 1/2 MS 培养基获得无菌苗; 切取 4 d 苗龄的无菌苗带柄子叶作为外植体, 在分化培养基 MS + 0.6 mg/L NAA + 6 mg/L 6-BA + 4 mg/L AgNO₃ + 0.25 mg/L ABA 上预

培养 2 d。浸入用 MS 液体培养基悬浮至 OD₆₀₀ = 0.3~0.6 的农杆菌液中感染 10 min, 无菌滤纸吸去残留菌液后, 重新接入分化培养基中暗培养 2 d; 转接至含 6.5 mg/L PPT 和 200 mg/L Cb 的抑菌筛选培养基上对获得的不定芽进行多代筛选, 淘汰未转化的白化芽和嵌合体, 获得多个具 PPT 抗性的绿色不定芽。对获得的抗性芽进行快繁后, 一部分进行离体保存, 一部分抗性芽接种至 MS + 0.1 mg/L IAA + 0.2 mg/L NAA + 150 mg/L Cb 上进行生根培养。生根的转基因株进行炼苗后, 移栽至泥炭土营养钵中, 最后定植于大田中, 正常管理至植株开花, 观察生物学性状进行功能鉴定。

2.1.2 转基因植株的分子生物学鉴定

本试验共侵染大概 5000 个外植体, 经过 PPT 多代筛选, 获得 26 个抗性芽, 记为 26 个株系。经过快繁后, 对 26 个株系中的 45 个抗性芽进行 PCR 检测, 有 10 个株系扩增出了 330 bp 左右的特异带, PCR 阳性率为 22.2%; 而未转化的阴性对照植株的 DNA 没有扩增出特异带(图 1), 而后对 PCR 检测表现阳性的 10 个株系继续进行 Southern blotting 杂交检测(见图 2), 结果显示 10 个转基因株系均有杂交信号出现, 表明目的基因(TA29-Barnase 基因)已经整合到了菜心基因组中。为了检验目的基因是否表达, 用半定量 RT-PCR 进行了检测, 提取转基因植株的花蕾总 RNA 进行分析(见图 3), 结果表明目的基因在不同的转基因植株中的表达存在差异, 在未转基因植株中没有目的基因表达。

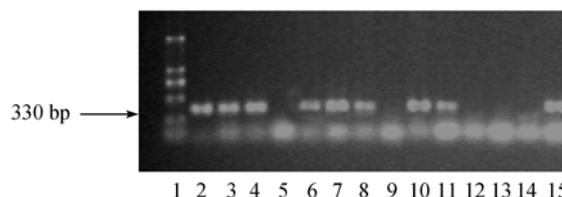


图 1 抗性芽 DNA 的 PCR 扩增检测结果

Fig. 1 the PCR detection of resistant buds of transformations
1: marker; 2~4: positive CK(plasmid DNA); 5: nontransformation plants; 6~15: resistant buds transformation

2.2 转基因植株的育性性状检测

经过快繁后, 共 30 株转基因植株移栽后, 恢复正常生长后, 在日/夜温度为 25°C/20°C 下人工温室放置, 能正常开花, 花器官外观结构与非转化植株无明显差异, 只是转基因植株开的花, 其雌蕊(柱头)明显高

于雄蕊(花药),花药大部分表现邹缩,而非转化植株的花,柱头和花药几乎平齐,也有的花朵,柱头稍微高于花药(图 4)。转基因植株中有 11 株没有花粉的产生,19 株有少量花粉产生,但是花粉量明显少于非转化植株。通过花粉 TTC 染色以及萌发试验结果表明,转基因植株产生的花粉染色很浅(图 5),而且几乎完全不萌发,全部表现不育,而对照植株花粉萌发率达到 90%以上(图 6)。开花后 7 天,转基因植株移到大棚,直到花期结束,日夜温度为 30°C~35°C/25°C~28°C,全部转基因植株自交不能正常结实,极少数能结荚,但是都是空荚,没有种子,表明转基因植株没有出现育性恢复现象,但是在大棚内转基因植株授上对照植株的花粉能够正常结实(图 7),而且转基因植株没有出现黄化现象。表明目的基因导入到菜心以后,影响了花粉的发育,导致花粉败育或产生少量没有活力的花粉,但是对柱头的授粉受精能力没有什么影响。

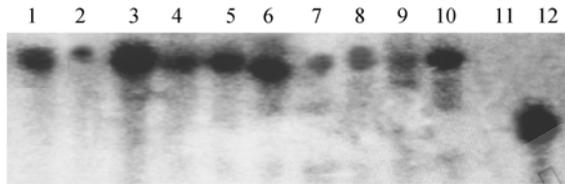


图 2 菜心转基因植株的 Southern blotting 杂交检测结果图
Fig. 2 Southern blotting detection of transgenic plants
 1~10: transgenic plants; 11: blank CK (nontransformation); 12: positive CK (PCR production of *barnase* gene)

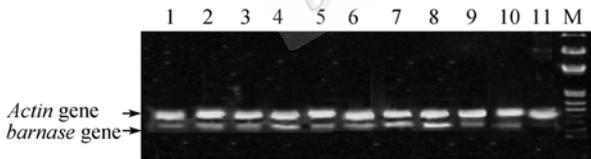


图 3 菜心转基因植株的半定量 RT-PCR 检测结果图
Fig. 3 RT-PCR detection of transgenic plants
 1~10: transgenic plants; 11: nontransformation plant; M: marker (λ EcoR I/Hind III)

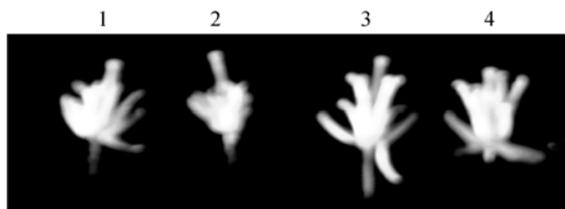


图 4 转基因菜心与对照花器官比较
Fig. 4 The stigma, anther of transgenic plant and CK
 1~2: transgenic plant; 3~4: untransformation plant

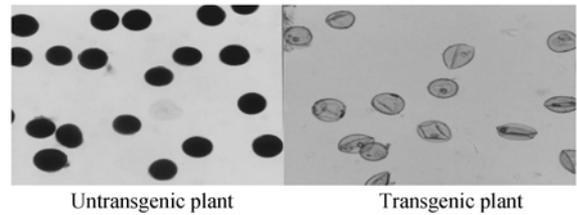


图 5 转基因植株与对照花粉 TTC 染色活力比较
Fig. 5 The pollen vigor analysis of transgenic plant and CK

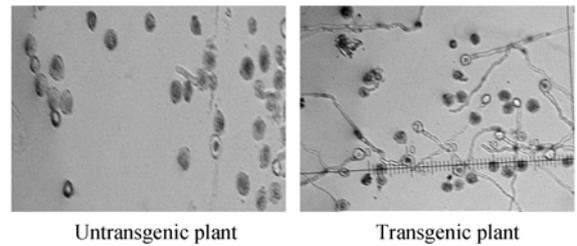


图 6 转基因植株与对照花粉发芽比较
Fig. 6 The pollen germination of transgenic plant and CK

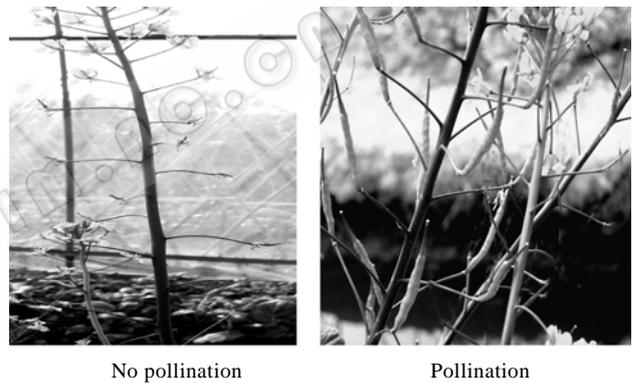


图 7 转基因植株授粉与不授粉结荚比较
Fig. 7 The pod of transgenic plant by being pollinated and no pollination

2.3 转基因雄性不育植株配制杂交组合优势分析
 选用 10 株表现高度不育(没有产生花粉)的转基因植株的部分花枝进行杂交试验,用“柳叶油青菜心”、“油青 80 天”为父本,进行授粉,做上标记,结果表明不育花朵结荚正常,每个荚能够结 15~25 粒种子。收获种子后,播种田间,比较 F1 植株与“柳叶油青菜心”、“油青 80 天”、“四九菜心”的生长情况以及产量。结果表明,不同雄性不育植株用相同父本授粉杂交后获得的 F1 植株在田间表现整齐一致,株间差别不明显,具体统计结果见表 1。从实验结果可以看出, F1 植株在株高,单穗重,总产量等方面较对照表现出明显优势,表明在菜心中开展优势育种有一定的潜力。

表 1 杂交组合与不同菜心品种的产量比较
Table 1 Comparison the yield of hybrid combination with that of other varieties

Material	Height/cm	Per stalk weight/g	Analysis of variance		Total yield/kg	Analysis of variance	
			$\alpha_{0.05}$	$\alpha_{0.01}$		$\alpha_{0.05}$	$\alpha_{0.01}$
Sjiucaixin	26	22.03	b	B	7.13	b	B
Liuyeyouqing	28	25.16	b	B	7.21	b	B
Youqin 80	32	26.15	b	B	8.30	b	B
ms × Liuyeyouqing	35	32.50	a	A	10.06	a	A
ms × Youqin 80	36	36.63	a	A	11.42	a	A

2.4 转基因植株雄性不育性状的保持与遗传分析

利用“四九”菜心的未转化植株作保持系与转基因不育株进行授粉杂交,对获得的种子,一部分播种于田间,对 175 株植株进行花期育性调查,结果发现 83 株植株表现不育,其中 22 株没有产生花粉,61 株有少量无活力的花粉,92 株表现可育,不育植株与可育植株的比例接近 1:1($X^2=0.28 < X^2_{0.05}=3.84$)。对 83 株不育株与 92 株可育株进行目的基因的 PCR 检测(见图 8),结果显示不育株都带有 *barnase* 基因,而可育株没有,表明目的基因可以稳定的遗传和表达,同时表明利用未转化植株作保持系与不育株杂交,可以获得近 50% 不育株。由于 *barnase* 基因连锁抗除草剂基因 *bastar*,因此转基因后代中含有目的基因的植株必定表现对一定浓度的 PPT(除草剂 *bastar* 的有效成分)的抗性,而非转基因植株则对 PPT 没有抗性。为此我们进行了验证。首先把保持系与不育株杂交获得的种子播种于田间,出苗 115 株,在两片子叶完全展开时,喷洒 10 mg/L 的 PPT 2~3 次,经过 2 天后,有 61 株幼苗死亡,54 株存活,存活的幼苗长大后,对它们进行 *barnase* 基因 PCR 检测(图 9),结果表明,存活的植株都含有目的基因,而且开花后都表现不育,自交不能够结籽。研究证实保持系与不育株杂交后代中存在的 50% 可育株,通过苗期喷洒 10 mg/L 的 PPT,可以完全被杀死,这为以后利用该雄性不育系开展优势育种和 F1 种子制种时,获得 100% 的不育株提供依据。

目前在菜心育种中由于找不到理想的雄性不育系和自交不亲和系,导致菜心不能很好的开展优势育种,限制了一些优良资源的利用,也影响了菜心品质育种和抗病育种。但利用雄性不育系来开展菜心优势育种是最有潜力的方法。本研究通过转基因手段获得的菜心转基因雄性不育株,为以后开展菜

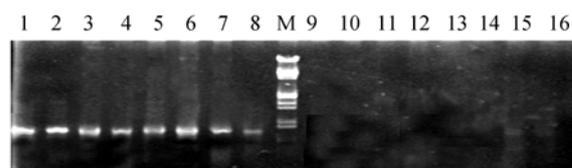


图 8 转基因杂交后代的不育株与可育株的 PCR 检测
Fig. 8 PCR detection of MS and male fertility plants in progenies of transgenic plant

M: marker; 1: positive CK; 2~8: MS plants; 9: blank CK; 10~16: male fertility plants

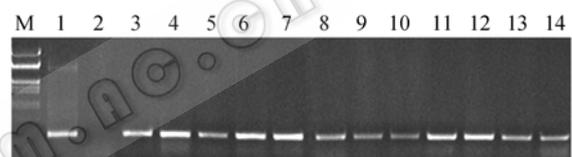


图 9 转基因后代抗 PPT 植株的 PCR 检测

Fig. 9 PCR detection of PPT-resistant plant of progenies transgenic plant

M: marker; 1: positive CK; 2: Blank CK; 3~14: PPT-resistant plant

心雄性不育系的选育提供了一个新的不育源,我们希望经过多代选择后,能够选育出适合菜心的雄性不育系。利用 *barnase* 转化植物获得雄性不育材料,不同研究者获得的研究结果不一样,有的获得雄性不育植株比较少,有的获得雄性不育植株比较多,可能是研究者所用材料不同缘故,在本研究中菜心的转化率为 0.2%,因此还需要建立一个高效的转化系统。但是在不育性状方面,大多数研究者获得的转 *barnase* 基因雄性不育植株表现为高度不育(没有花粉的产生)或有少量花粉产生(但是花粉活力低),自交不能结实,与正常花粉授粉后结实正常,本研究中获得的结果与他人的研究结果大致相似。但是有的研究者认为 *barnase* 基因产生的雄性不育在高于 20°C 高温下存在育性恢复现象,而我们得到的转基因植株在 30°C~35°C/25°C~28°C 的高温下,自交全部不能结籽,说明没有发生育性恢复,这也可

能与构建的花药特异嵌合启动子有关,这与陈潜等人^[14]的研究一致。我们的研究结果也表明利用 *barnase* 基因开展植物雄性不育基因工程是一条有效的途径。本研究中含有 *barnase* 的转基因植株均表现不育,有的花药瘪缩,可能是与 *barnase* 高度表达有关。我们利用未转化植株作保持系与获得的转基因雄性不育株杂交后,获得的后代能够分离出 50% 的不育植株,在苗期通过喷洒一定浓度的除草剂 *bastar* 可以有效的杀死可育植株,这为以后利用该工程雄性不育系开展菜心优势育种提供了很好的实验依据。

REFERENCES

- [1] Seurinck J, Truettner J, Goldberg RB. The nucleotide sequence of an anther 2 specific gene. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(11): 3403.
- [2] Mariani C, Beuckeleer MD, Truettner J, Frederic F, Hainaut F, Thomasset M, Guenet JL, Delhaye Bouchaud N, Mariani J. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 1990, **347**(25): 737-741.
- [3] Mariani C, Goicoa MA, Mariani AL, Palacios MF, Testoni RA, Ian nitelli PS, Diez RA, Sen L, Estevez ME. A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restore fertility to male sterile plant. *Nature*, 1992, **357**(4): 384-387.
- [4] Zhong R, Liu YL, Zhu F, Li SG, Kang LY, Luo P. Induction of male sterility in oilseed rape by TA29-*barnase* gene. *Acta Botanica Sinica*, 1996, **38**(7): 582-585.
钟蓉, 刘玉乐, 朱锋, 李胜国, 康良仪, 罗鹏. TA29-*Barnase* 基因导致油菜雄性不育的研究. *植物学报*, 1996, **38**(7): 582-585.
- [5] Li SG, Liu YL, Zhu F, Luo YY, Kang LY, Tian B. Gaining male sterility tobacco by gene engineering. *Acta Botanica Sinica*, 1995, **37**(8): 659-660.
李胜国, 刘玉乐, 朱锋, 罗玉英, 康良仪, 田波. 基因工程雄性不育烟草的获得. *植物学报*, 1995, **37**(8): 659-660.
- [6] Reynaerts A, Jarvis CI, Staels B, Brugg B, Lemaigre Dubreuil Y, Tedg A. Engineered genes for fertility control and their application in hybrid seed production. *Scientia Horticulturae*, 1993, **55**: 125-139.
- [7] Leemans J, Mariani C. Progress in engineering gene for fertility control. Program and Abstracts, ISPMB Third International Congress, Tucson, USA, 1991, 6-11.
- [8] Hiatt A, Ma JK. Monoclonal antibody engineering in plants. *FEBS Letters*, 1992, **307**(1): 71-75.
- [9] Shen GZ, Wang XQ, Zhu YY, Yang HJ. Male sterility transgenic plants with TA29-*Barnase*. *Acta Physiologica Sinica*, 2001, **27**(1): 43-48.
沈革志, 王新其, 朱玉英, 杨红娟. TA29-*barnase* 基因转化甘蓝产生雄性不育植株. *植物生理学报*, 2001, **27**(1): 43-48.
- [10] Bai L, Liu F, Li SP, Cao MQ. *Agrobacterium* mediated *barnase* gene transfer tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Henan University (Natural Science)*, 2002, **32**(3): 16-19.
白玲, 刘凡, 李锁平, 曹鸣庆. 农杆菌介导 *Barnase* 基因转化番茄. *河南大学学报(自然科学版)*, 2002, **32**(3): 16-19.
- [11] Li SG, Liu YL, Zhu F, Luo YY, Kang LY, Tian B. Gene engineering male sterility tobacco plants and their sterility to temperature. *Acta Botanica Sinica*, 1997, **39**(3): 231-235.
李胜国, 刘玉乐, 朱锋, 罗玉英, 康良仪, 田波. 基因工程雄性不育烟草及其温度敏感性. *植物学报*, 1997, **39**(3): 231-235.
- [12] Zhou XR, Peng RW, Fang RX, Chen ZH, Mang KQ. Obtaining male sterility oilseed rape by specific expression of *Rnase* gene. *Acta Genetic Sinica*, 1996, **24**(6): 531-536.
周雪荣, 彭仁旺, 方荣祥, 陈正华, 莽克强. 表达核糖核酸酶基因的雄性不育油菜的获得. *遗传学报*, 1996, **24**(6): 531-536.
- [13] Song HY, Ding JG, Cao BH, Lei JJ, Song M. Construction of the expression vectors for artificial male sterility gene and fertility restoring gene. *Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science)*, 2004, **26**(3): 429-253.
宋洪元, 丁建刚, 曹必好, 雷建军, 宋明. 人工雄性不育基因及恢复基因表达载体的构建. *西南农业大学学报*. 2004, **26**(3): 429-253.
- [14] Chen Q, Wang YC, Zhang LM, Li WB, Sun YR. Construction anther specific chimeric promoter and further establishment of transgenic artificial male sterile *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2001, **9**(1): 62-64.
陈潜, 汪迎春, 张利明, 李文彬, 孙勇如. 花药特异嵌合启动子的构建及雄性不育转基因拟南芥的获得. *农业生物技术学报*, 2001, **9**(1): 62-64.