

# 羽衣甘蓝 *ARC1* 的基因分离、表达及与 SRK 相互作用的分析

蓝兴国, 杨 佳, 赵 昕, 李玉花\*

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

**摘 要:** 以羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 自交不亲和系 ( $S_{13-b}S_{13-b}$ ) 为试验材料, 利用 RT-PCR 的方法分离其 *ARC1* 基因 cDNA 序列 (命名为 *BoARC1*, GenBank 登录号为 EU344909)。 *BoARC1* cDNA 序列中含有 1 个 1 992 bp 的开放读码框 (ORF), 编码 1 个含有 663 个氨基酸的蛋白质。羽衣甘蓝 *BoARC1* 与油菜 *BnARC1* 的氨基酸序列具有 94% 的一致性; Southern 杂交结果显示 *BoARC1* 在基因组中只存在单一拷贝; Northern 杂交结果显示 *BoARC1* 特异性地在柱头组织中表达; 在酵母双杂交试验分析中, *BoARC1* 能够与 SRK<sub>3</sub>、SRK<sub>13-b</sub> 和 SRK<sub>910</sub> 的胞内激酶域发生相互作用。

**关键词:** 羽衣甘蓝; 自交不亲和; *ARC1*; 相互作用

**中图分类号:** S 681.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 12-2342-07

## Isolation, Expression of *ARC1* from Ornamental Kale and Interaction Analysis Between *ARC1* and SRK

LAN Xing-guo, YANG Jia, ZHAO Xin, and LI Yu-hua\*

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** The *ARC1* cDNA sequence was isolated from stigma of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*)  $S_{13-b}S_{13-b}$  homozygotes using RT-PCR techniques, named *BoARC1* (GenBank accession No. EU344909). The *BoARC1* cDNA sequence had an ORF of 1 992 bp, encoding a 663-aa protein. The deduced amino acid sequence of isolated *BoARC1* shared 94% identity with *Brassica napus* *ARC1*. Southern blot analysis showed that there was a single copy of *BoARC1* gene in genome. Northern blot analysis showed that *BoARC1* mRNA only expressed in the stigma. The yeast two-hybrid analysis indicated that the *BoARC1* interacted with SRK<sub>3</sub>, SRK<sub>13-b</sub> and SRK<sub>910</sub>.

**Key words:** *Brassica oleracea* var. *acephala*; self-incompatibility; *ARC1*; interaction

自交不亲和性 (Self-incompatibility, SI) 是显花植物采取的一种避免自交, 促进种内遗传多样性的机制 (Franklin-Tong, 2008)。芸薹属植物 SI 反应是由花粉外壁蛋白 SCR (S-locus cysteine-rich protein) /SP11 (S-locus protein 11) 与柱头乳突细胞膜 SRK (S-locus receptor kinase) 受体特异性相互作用引起的 (Kachroo et al., 2001; Takayama et al., 2001; 杨洋 等, 2009)。SCR/SP11 配体是一

收稿日期: 2011-05-10; 修回日期: 2011-10-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900115, 31070275); 中央高校基本科研业务费专项基金项目 (DL09BA08)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lyhshen@126.com)

个低相对分子质量并富含半胱氨酸的分泌蛋白, 决定花粉的 SI (Schopfer et al., 1999; Takayama et al., 2000)。

SRK 受体具有 3 个结构域: 胞外域、跨膜结构域和胞内激酶域, 控制柱头乳突细胞的 SI (Goring & Rothstein, 1992; Takasaki et al., 2000)。当花粉落到柱头表面之后, 花粉 SI 信号分子 SCR/SP11 转运到柱头乳突细胞的表面, 被受体 SRK 的胞外域识别, 并引起 SRK 胞内域的磷酸化, 通过下游的信号传递来完成 SI 反应 (Cabrillac et al., 2001; 王艳红 等, 2009; Ivanov et al., 2010; Tantikanjana et al., 2010)。

利用酵母双杂交系统筛选 SRK 相互作用的蛋白, 获得了 ARC1 (armadillo repeat-containing protein 1)、激酶相关的蛋白磷酸酶 (kinase associated protein phosphatase)、硫氧还蛋白、钙调蛋白 (calmodulin) 和分选连接蛋白 (sorting nexin) (Bower et al., 1996; Gu et al., 1998; Vanoosthuysen et al., 2003)。其中, ARC1 作为 S 位点受体激酶 (SRK) 的下游底物, 在自交不亲和信号传递过程中起着正调控因子的作用。转入 *ARC1* 反义基因的植株具有部分打破 SI 的现象 (Stone et al., 1999)。此外, 在体外泛素化试验中, ARC1 具有 E3 泛素连接酶的活性; 而且在自交授粉过程中, 柱头内蛋白质泛素化的水平特异性地增高 (Stone et al., 2003; 蓝兴国 等, 2009, 2010)。因此认为, ARC1 利用其 E3 泛素连接酶的活性, 将其下游底物通过泛素/26S 蛋白酶体途径降解而引起 SI 反应。

本研究中以羽衣甘蓝自交不亲和系 ( $S_{I3-b}S_{I3-b}$ ) 为研究试材, 分离了 *ARC1* (*BoARC1*) 基因。对 *BoARC1* 进行序列及基因组拷贝数的分析, 通过 Northern 杂交检测 *BoARC1* mRNA 的表达模式, 利用酵母双杂交系统检测 *BoARC1* 与 SRK 胞内激酶域间的相互作用, 从而为深入探讨 SI 的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及其 *BoARC1* cDNA 的分离

将羽衣甘蓝自交不亲和系 ( $S_{I3-b}S_{I3-b}$ ) 于 2008 年 6 月—2009 年 5 月种植于东北林业大学花卉生物工程研究所。

采集开花当天的柱头, 利用 CTAB 法提取柱头总 RNA (蓝兴国 等, 2009)。

RNA 反转录采用 AMV 反转录酶 (TaKaRa) 和锚定引物 Oligo (dT)<sub>18</sub>, 反转录的程序为 42 °C 孵育 30 min, 99 °C 变性 5 min 和 4 °C 孵育 5 min。根据油菜 *BnARC1* 的 5' 和 3' 末端编码区 (Gu et al., 1998) 设计 *BoARC1* 特异性引物 1 (5'-TGTTTCATTGATGTTCTACCC-3') 和引物 2 (5'-GTTCTCTATCATAAGACC-3'), 进行 *BoARC1* 编码区序列的扩增。

PCR 以反转录的第 1 条链作为模板, 利用 LA *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa) 进行反应, 扩增条件为 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用 MagExtractor-PCR & Gel Clean up (东洋纺) 回收, 与 pGEM-T 载体连接, 转化到 Top10 菌株中, 挑选阳性克隆, 进行 DNA 序列测定。

### 1.2 *BoARC1* 的 Southern 杂交分析

提取叶片组织基因组 DNA (6 ~ 7 μg), 分别用 *EcoR* I、*Xba* I、*Sal* I 限制性内切酶进行消化后, 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离; 然后将 DNA 片段转移到 Hybond<sup>TM</sup>-N 尼龙膜上; 探针是以获得的 *BoARC1* 编码区序列设计的引物 1 (5'-GGTTACGACCTCAAAACAGG-3') 和引物 2 (5'-TCC

GGTCCAAATCACACAAC-3'), 扩增片段长度为 308 bp, 用地高辛标记; 凝胶在变性液 ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 和  $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl) 中处理后,  $65^\circ\text{C}$  水浴锅中过夜杂交; 杂交后用 2% SSC 和 0.1% SDS 的溶液在室温下洗膜两次, 每次 5 min; 再用 0.1% SSC 和 0.1% SDS 溶液在  $65^\circ\text{C}$  洗 30 min, 进行 X 光片显影。

### 1.3 *BoARC1* 的 Northern 杂交分析

提取根、茎、叶、花瓣、花药和不同发育阶段柱头的总 RNA ( $15 \mu\text{g}$ ), 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离; 然后将 RNA 片段转移到 Hybond<sup>TM</sup>-N 尼龙膜上; 探针与 Southern 杂交探针相同; 尼龙膜在  $65^\circ\text{C}$  水浴锅中过夜杂交; 杂交后用 2% SSC 和 0.1% SDS 的溶液在室温下洗膜两次, 每次 5 min; 再用 0.1% SSC 和 0.1% SDS 溶液在  $65^\circ\text{C}$  洗 30 min, 进行 X 光片显影。

### 1.4 *BoARC1* 与 *SRK* 的酵母双杂交分析

将 *BoARC1*、*BnARC1* (Gu et al., 1998) 全长编码区 cDNA 连接到 pGADT7 酵母表达载体中, 构建 AD-*BoARC1*、AD-*BnARC1* 质粒, 利用的引物为 BO1 (5'-GGAATTCCATATGGCCACTGATTCAGCAATGTTC-3') 和 BO2 (5'-CAGAATTCTTATCTCTGTGTTTTCTGGTCGC-3'); BN1 (5'-GGAATTCCATATGGCCACTGATTCAGCAATGTTC-3') 和 BN2 (5'-CAGAATTCTTATCTCTGTGTTCTGGTCGC-3')。

另一方面, 将编码甘蓝 *SRK<sub>3</sub>* (Delorme et al., 1995)、羽衣甘蓝 *SRK<sub>13-b</sub>* (蓝兴国 等, 2010)、油菜 *SRK<sub>910</sub>* (Goring et al., 1992) 激酶结构域的 cDNA 分别连接到酵母表达载体 pGBDT7 中, 构建 BD-*SRK<sub>3</sub>*、BD-*SRK<sub>13-b</sub>*、BD-*SRK<sub>910</sub>*, 利用的引物为 *SRK<sub>3</sub>-1* (5'-CGGAATTCAAAAGAAAACAAAA GCGAGC-3') 和 *SRK<sub>3</sub>-2* (5'-CGGGATCCTTACCGGGCATCGATGAATGAGC-3'); *SRK<sub>13-b</sub>-1* (5'-CATG CCCATGGAGAAAAGGAAACAAAATCGAGC-3') 和 *SRK<sub>13-b</sub>-2* (5'-CGGGATCCTTACCGGGCATCGA TGAATGAGC-3'); *SRK<sub>910</sub>-1* (5'-CATGCCCATGGAGAAAAGGAAACAAAAGCGAGC-3') 和 *SRK<sub>910</sub>-2* (5'-CGGGATCCCTACCGGGCATCGATGTCTGA-3')。

酵母双杂交系统参照 Clontech 公司的 GAL4 Two-Hybrid System 3 系统的说明书, 使用的酵母菌株为 Y187, 采用醋酸锂转化法进行酵母的转化, 利用滤纸转移法检测  $\beta$ -半乳糖苷酶的分泌, 将附着有酵母克隆的滤纸在液氮速冻后, 放在浸有 Z-buffer/X- $\beta$ -Gal 的滤纸上, 在室温孵育 2 h 内, 显蓝色为阳性结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BoARC1* 基因的克隆与序列分析

利用已知油菜 *BnARC1* 基因的序列设计引物, 通过 RT-PCR 的方法从羽衣甘蓝的柱头组织中获得 *ARC1* (*BoARC1*) 的 cDNA 序列, GenBank 收录号为 EU344909。

*BoARC1* 的 cDNA 序列含有一个 1 992 bp 的开放读码框 (ORF), 编码一个含有 663 个氨基酸的蛋白质。通过氨基酸序列比对分析显示, *BoARC1* 的序列与油菜 *BnARC1* 的序列具有 94% 的一致性 (图 1)。

|                  |   |
|------------------|---|
| BoARC1 (1-60)    | MATDSAMFASSRRRQSPSLEAFLSPVDLSDVPLLTLSSTSSSEIVSCFSNARFSFQRRNT  |
| BnARC1 (1-60)    | MATDSAMFASSRRRQSPSLEAFLSPVDLSDVPLLTLSSTSSSEIVSCFSNARFSFQRRNT  |
| BoARC1 (61-120)  | RSLIRKVQVI <del>AVLLQHLAP</del> ESSLDPTAVLCFKELYLLHHSKFLRLRYCAHSSKLWLLQS  |
| BnARC1 (61-120)  | RSLIRKVQVE <del>AVLLQHLAP</del> ESSLDPTAVLCFKELYLLHHSKFLRLRYCAHSSKLWLLQS  |
| BoARC1 (121-180) | PSLSSFFHDLSKDYSTLLDVL <del>LP</del> PAESLCLNDDVREQVQLLHM <del>QHYVDDN</del> DET <del>LRNRLYS</del>                |
| BnARC1 (121-180) | PSLSSFFHDLSKDYSTLLDVL <del>FP</del> VD <del>SL</del> CLNDDVREQVQLLHM <del>QHYVDDN</del> DET <del>LRNRLYS</del>    |
| BoARC1 (181-240) | FLDEFENGSPVNSEELS <del>FFFFEKL</del> G <del>IKDPTS</del> YRDEIEFLEE <del>IK</del> TYGCDLEPTRSVINGF                |
| BnARC1 (181-240) | FLDEFENGSPVNSEEL <del>RFFFFEKL</del> A <del>IKDPTS</del> YREEIEFLEE <del>IK</del> SHGCDLDPTRSVINGF                |
| BoARC1 (241-299) | <del>VD</del> ITRYVMFLLFKIEDS <del>NEIKKQ</del> RKGLISEEIENTFTT-LPKDFICSISLNIMNDP <del>VVIV</del>                 |
| BnARC1 (241-299) | <del>ID</del> ITRYVMFLLFKIEDG <del>NEIKKQ</del> RKRLISEEIENTFTT <del>LP</del> PKDFICSISLNIMNDP-VII                |
| BoARC1 (300-359) | STGQTYDRSSIARWIHQEGRSTCPKGTGQKLV <del>DL</del> SFV <del>PNL</del> ALRHLTTLC <del>QV</del> NGLSHD <del>SP</del>    |
| BnARC1 (300-358) | STGQTYDRTSIARWIHQEGRSTCPKGTGQKLV <del>DL</del> SFV <del>SNL</del> ALRHLTTLC <del>EV</del> TGLSHD <del>SP</del> -  |
| BoARC1 (360-419) | <del>PK</del> ESLPKVFQTRASTEANKA <del>AI</del> SILV <del>RN</del> LAHGS <del>EL</del> AAGEIRVLTRTVTETRTLIVEAGAI   |
| BnARC1 (359-417) | - <del>KES</del> LPKVFQTRASTEANKAT <del>LS</del> SILV <del>QN</del> LAHGS <del>EL</del> AAGEIRVLTRTVTETRTLIVETGAI |
| BoARC1 (420-479) | PYLRSLLKSEN <del>AV</del> AQENAVASIFNLSIDEANRSLIMEEHDCLEPIMSVLVSGLTMR <del>AKEI</del>                             |
| BnARC1 (418-477) | PYLRSLLKS <del>Q</del> NAVAQENAVASIFNLSIDEANRSLIVEEHDCLEPIMSVLVSGLTMR <del>AKEI</del>                             |
| BoARC1 (480-539) | ATAALYTLSSVHDYKKTIANADGCIESLALVLRNGTVRGKKDAVYALHSLWLHPDNC <del>SLV</del>  |
| BnARC1 (478-537) | AAATLYTLSSVHDYKKAIANADGCIEALALVLRNGTVRGKKDAVYALHSLWLHPDNC <del>SLM</del>  |
| BoARC1 (540-599) | VKRGVSALVGALGEESVAEKVACVLGVMATESLGAESIGREETVVTGLMELMRCGR <del>PLG</del>   |
| BnARC1 (538-597) | VKRGVSALVGALGEEA <del>VAEKV</del> AVVLGVMATESLGAESIGREETVVTGLMELMRCGR <del>PRG</del>                              |
| BoARC1 (600-659) | KEKAIATLLQLCTLGGAVVTEKVVKTPALAVLTRKLLLTGTDRAKRKA <del>VS</del> LSKVCKGCDQ   |
| BnARC1 (598-657) | KEKAIATLLQLCTAGGAVVTEKVVKTPALAVLTRKLLLTGTDRAKRKA <del>VS</del> LSKVCKGCDQ   |
| BoARC1 (660-663) | KTQR  |
| BnARC1 (658-661) | NTQR  |

图1 羽衣甘蓝 BoARC1 与油菜 BnARC1 氨基酸序列比对

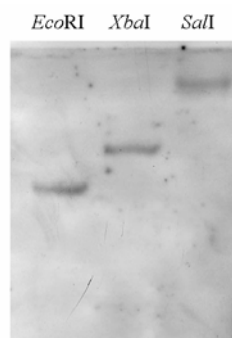
不一致的氨基酸序列比对用灰色背景显示,“-”代表空位。

Fig. 1 Alignment of predicted amino acid sequences between BoARC1 and BnARC1

Different residues are shaded gray. “-” are introduced to optimize the alignment.

## 2.2 *BoARC1* 的 Southern 杂交分析

为了分析 *BoARC1* 在羽衣甘蓝基因组中的拷贝数,将其基因组 DNA 经 *EcoR* I、*Xba* I、*Sal* I 限制性内切酶酶切消化,用 *BoARC1* 探针进行杂交,结果显示只有单一的条带(图2),这说明 *BoARC1* 可能在基因组中只存在单一的拷贝。而且,在获得的 *BoARC1* 序列中不存在 *EcoR* I、*Xba* I、*Sal* I 限制性内切酶酶切位点,这进一步确定 *BoARC1* 在基因组中只存在单一的拷贝。

图2 *BoARC1* 的 Southern 杂交分析Fig. 2 Southern blot analysis of *BoARC1*

## 2.3 *BoARC1* 的表达分析

为了分析 *BoARC1* 在植物组织中的表达情况,分别提取各组织中的总 RNA,利用 Northern 杂交的方法进行检测。结果表明, *BoARC1* 在根、茎、叶、花瓣、花药中没有表达,只在柱头中有表达,在柱头发育的早期阶段(1~4 mm、4~6 mm 花蕾内的柱头)表达量较低,在柱头接近成熟阶段(6~8 mm、8~10 mm 花蕾内的柱头和接近开花的花蕾)表达量增高(图3)。

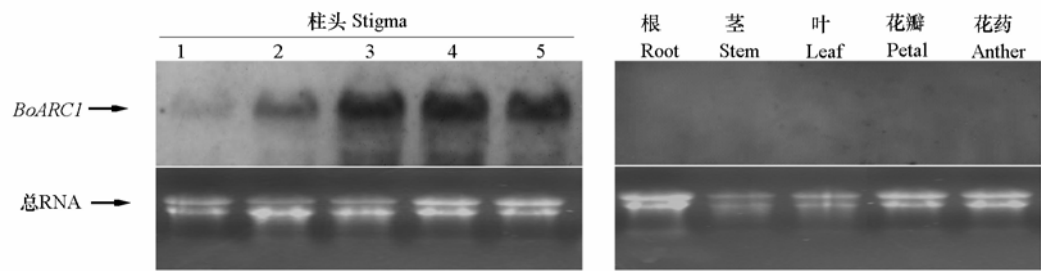


图 3 *BoARC1* 的表达分析

1: 0~4 mm 花蕾; 2: 4~6 mm 花蕾; 3: 6~8 mm 花蕾; 4: 8~10 mm 花蕾; 5: 接近开花的花蕾。

Fig. 3 Expression analysis of *BoARC1*

The stage numbers correspond to different bud sizes. 1: 0 - 4 mm; 2: 4 - 6 mm; 3: 6 - 8 mm; 4: 8 - 10 mm; 5: Approaching the flowering period.

2.4 *BoARC1* 与 *SRK* 相互作用的分析

将 *BoARC1*、*BnARC1* 的编码区序列构建到 pGADT7 载体中, 获得 AD-*BoARC1* 和 AD-*BnARC1* 质粒; 把羽衣甘蓝 *SRK*<sub>13-b</sub>、甘蓝 *SRK*<sub>3</sub>、油菜 *SRK*<sub>910</sub> 的编码胞内域的序列构建到 pGBDT7 载体中, 获得 BD-*SRK*<sub>13-b</sub>、BD-*SRK*<sub>3</sub>、BD-*SRK*<sub>910</sub> 质粒。为了分析 *BoARC1* 与 *SRK* 胞内域的相互作用, 将获得的质粒相应地共转化到 Y187 酵母菌株。结果表明, 共转化的酵母菌株能够在双缺陷 (-leu-trp) 培养基中正常的生长, 并且通过 X-β-gal 显色检验成蓝色 (图 4), 这说明 *BoARC1*、*BnARC1* 分别与 *SRK*<sub>13-b</sub>、*SRK*<sub>3</sub>、*SRK*<sub>910</sub> 的胞内域存在相互作用。

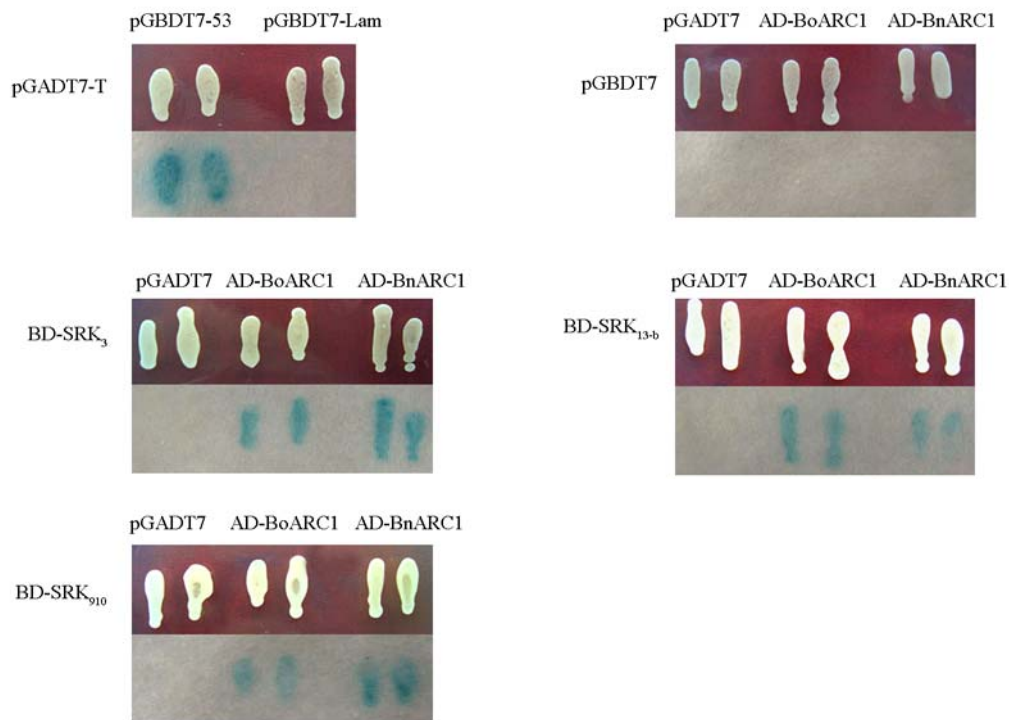


图 4 利用酵母双杂交检测 *ARC1* 与 *SRK* 的相互作用

pGADT7-T 和 pGBDT7-53 质粒、pGADT7-T 和 pGBDT7-Lam 质粒分别共转化到酵母细胞中, 作为阳性和阴性对照。

Fig. 4 Interaction analysis between *ARC1* and *SRK* in the yeast two-hybrid system

Combinations of pGADT7-T and pGBDT7-53, pGADT7-T and pGBDT7-Lam were the positive and negative controls, respectively.

### 3 讨论

羽衣甘蓝是我国北方秋冬季节深受人们喜爱的一种观赏和食用植物。由于大部分羽衣甘蓝栽培品种具有 SI, 在育种过程中受到了人们的关注并且得到了应用。在本研究中, 为了进一步探讨 SI 的分子机制, 作者从具有较强 SI 的羽衣甘蓝自交不亲和系 ( $S_{13-b}S_{13-b}$ ) 中分离出 *BoARC1* 基因。*BoARC1* 在羽衣甘蓝的基因组中只存在单一的拷贝; 氨基酸序列比对分析显示 *BoARC1* 与油菜 *BnARC1* 具有较高 (94%) 的一致性; 并且 *BoARC1* 主要在柱头组织内特异性地表达, 而且在柱头接近成熟期时表达量较高, 这种表达的时空性是与 SI 反应相关的; 此外, 酵母双杂交试验分析显示 *BoARC1* 能够与不同 *S* 单倍型的 *SRK* 胞内域进行相互作用, 这说明 *BoARC1* 作为 *SRK* 下游的底物参与 SI 的反应。

芸薹属植物 SI 反应发生在授粉过程中多个阶段, 如花粉水合、花粉代谢的激活、花粉管的形成、花粉管穿入柱头乳突细胞壁等 (Heslop-Harrison, 1975), 这暗示 SI 信号转导的网路可能是复杂的。在反向遗传学研究中发现, *BnARC1* 的反义转基因植株表型没有发生变化, 但有打破 SI 的现象。因此认为, *ARC1* 在 SI 信号传递过程中起着正向调控因子的作用。此外, 在体外的生化分析中, *BnARC1* 具有 E3 泛素连接酶的活性, 而且在自交授粉过程中蛋白质泛素化水平增加, 因此推测 SI 反应是 *ARC1* 将其下游底物泛素化通过 26S 蛋白酶体途径降解引起的。最近发现, 一个蛋白囊泡转运和分泌复合体的成分 Exo70A1 作为 *ARC1* 下游的一个底物参与到 SI 反应中 (Samuel et al., 2009; Chong et al., 2010)。Exo70A1 能够被 *ARC1* 泛素化; 在转基因试验中, 过量表达 *Exo70A1* 的植株具有部分打破 SI 的现象; *Exo70A1* 功能丧失的植株干扰了亲和花粉管的生长。

目前, 虽然在 SI 信号转导途径中取得了一些进展, 但对于 *ARC1* 介导 SI 反应的机制还存在许多问题, 如 *ARC1*-Exo70A1 信号途径不能完全打破 SI, 这就暗示着 SI 信号网络还存在其它分支的可能。本研究中分离和鉴定出羽衣甘蓝 *BoARC1* 基因, 并且认为 *BoARC1* 作为 *SRK* 下游的底物参与 SI。这为下一步筛选 *BoARC1* 相互作用的蛋白, 通过功能获得和功能丧失的转基因试验来阐释 SI 的分子机制奠定了基础。

### References

- Bower M S, Matias D D, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein S J, Goring D R. 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* *S* locus receptor kinase. *Plant Cell*, 8: 1641 - 1650.
- Cabrillac D, Cock J M, Dumas C, Gaude T. 2001. The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, 410: 220 - 223.
- Chong Y T, Gidda S K, Sanford C, Parkinson J, Mullen R T, Goring D R. 2010. Characterization of the *Arabidopsis thaliana* exocyst complex gene families by phylogenetic, expression profiling, and subcellular localization studies. *New Phytol*, 185: 401 - 419.
- Delorme V, Giranton J L, Hatzfeld Y, Friry A, Heizmann P, Ariza M J, Dumas C, Gaude T, Cock J M. 1995. Characterization of *S* locus genes, *SLG* and *SRK* of the *Brassica* *S*<sub>3</sub> haplotype: Identification of a membrane-localized protein encoded by the *S* locus receptor kinase gene. *Plant J*, 7: 429 - 440.
- Franklin-Tong V E. 2008. Self-incompatibility in flowering plants: Evolution, diversity and mechanisms. Berlin: Springer - Verlag.
- Goring D R, Rothstein S J. 1992. The *S*-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell*, 4: 1273 - 1281.
- Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias D D, Goring D. 1998. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 382 - 387.
- Heslop-Harrison J. 1975. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annu Rev Plant Physiol*, 26: 403 - 425.
- Ivanov R, Fobis-Loisy I, Gaude T. 2010. When no means no: Guide to Brassicaceae self-incompatibility. *Trends Plant Sci*, 15: 387 - 394.

- Kachroo A, Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 2001. Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science*, 293: 1824 – 1826.
- Lan Xing-guo, Yang Jia, Li Yu-hua. 2009. Isolation and functional analysis of a *S<sub>13-b</sub>*-locus cysteine-rich gene of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (4): 539 – 544. (in Chinese)
- 蓝兴国, 杨 佳, 李玉花. 2009. 羽衣甘蓝花粉 *SCR<sub>13-b</sub>* 基因的分离及其功能分析. *园艺学报*, 36 (4): 539 – 544.
- Lan Xing-guo, Yang Jia, Wang Yan-hong, Li Yu-hua. 2010. Cloning of *SRK<sub>13-b</sub>* gene of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and prokaryotic expression of kinase domain of *SRK<sub>13-b</sub>*. *Letters in Biotechnology*, 21 (2): 210 – 212. (in Chinese)
- 蓝兴国, 杨 佳, 王艳红, 李玉花. 2010. 羽衣甘蓝 *S<sub>13-b</sub>* 位点受体激酶基因的克隆及激酶结构域的原核表达. *生物技术通讯*, 21 (2): 210 – 212.
- Lan Xing-guo, Yang Jia, Zhao Xin, Yu Kai, Li Yu-hua. 2010. Ubiquitination of protein level of stigma after pollination in *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Plant Physiol Commun*, 46 (3): 228 – 230. (in Chinese)
- 蓝兴国, 杨 佳, 赵 昕, 于 凯, 李玉花. 2010. 羽衣甘蓝授粉过程中柱头蛋白质的泛素化. *植物生理学通讯*, 46 (3): 228 – 230.
- Samuel M A, Chong Y T, Haasen K E, Aldea-Brydges M G, Stone S L, Goring D R. 2009. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell*, 21: 2655 – 2671.
- Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286: 1697 – 1700.
- Stone S L, Anderson E M, Mullen R T, Goring D R. 2003. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell*, 15: 885 – 898.
- Stone S L, Arnoldo M, Goring D R. 1999. A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in *ARC1* antisense transgenic plants. *Science*, 286: 1729 – 1731.
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K. 2000. The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, 403: 913 – 916.
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F-S, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A. 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc Natl Aca Sci USA*, 97: 1920 – 1925.
- Takayama S, Shimosato H, Shiba H, Funato M, Iwano M, Che F-S, Watanabe M, Iwano M, Isogai A. 2001. Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 413: 534 – 538.
- Tantikanjana T, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 2010. Complex networks of self-incompatibility signaling in the Brassicaceae. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 1 – 7.
- Vanoosthuyse V, Tichtinsky G, Dumas C, Gaude T, Cock J M. 2003. Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea* *S* locus receptor kinase. *Plant Physiol*, 133: 919 – 929.
- Wang Yan-hong, Li Yu-hua, Lan Xing-guo. 2009. Cell recognition for self-incompatibility in *Brassica*. *Plant Physiol Commun*, 45 (12): 1246 – 1250. (in Chinese)
- 王艳红, 李玉花, 蓝兴国. 2009. 芸薹属植物自交不亲和性中的细胞识别. *植物生理学通讯*, 45 (12): 1246 – 1250.
- Yang Yang, Gao Qi-guo, Song Ming, Niu Yi, Tang Qing-lin, Zhu Li-quan, Wang Xiao-jia. 2009. *In vitro* study on the interactions between determinant factors of self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (3): 355 – 362. (in Chinese)
- 杨 洋, 高启国, 宋 明, 牛 义, 汤青林, 朱利泉, 王小佳. 2009. 甘蓝自交不亲和决定因子的体外表达和相互作用的检测. *园艺学报*, 36 (3): 355 – 362.