

羽衣甘蓝花粉 SCR_{13-b} 基因的分离及其功能分析

蓝兴国, 杨 佳, 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*) $S_{13-b}S_{13-b}$ 自交不亲和系为试验材料, 分离了控制花粉自交不亲和基因—— S_{13-b} 单倍型富含半胱氨酸基因 (SCR_{13-b}), GenBank 收录号为 EF577028。 SCR_{13-b} cDNA 序列含有 237 bp 的开放读码框 (ORF), 编码一个含 78 个氨基酸的蛋白。 SCR_{13-b} gDNA 含有一个 758 bp 的内含子, 内含子 5 供体位点和 3 受体位点边界序列符合 GU-AG 规则; DNA blot 分析表明 SCR_{13-b} 在基因组中只有单一拷贝; 授粉生物活性分析试验显示原核表达 SCR_{13-b} 融合蛋白能够启动 SI 反应, 抑制杂交亲和花粉的萌发和生长。

关键词: 羽衣甘蓝; 自交不亲和; 原核表达

中图分类号: S 681.9; Q 781 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 04-0539-06

Isolation and Functional Analysis of a S_{13-b} -locus Cysteine-rich Gene of Ornamental Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

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

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

Abstract: The S_{13-b} -locus cysteine-rich gene (SCR_{13-b}) was isolated from pollen of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) S_{13-b} homozygotes, GenBank accession number is EF577028. The SCR_{13-b} cDNA sequence had an ORF of 237 bp, encoding a 78-aa protein. The genomic SCR_{13-b} sequence contained a 758 bp intron with boundary sequences of GT at 5' site and AG at 3' site, which complied with the typical 'GT-AG rule' in plants. Genomic DNA blot analysis showed that SCR_{13-b} was a single copy gene in $S_{13-b}S_{13-b}$ lines. Pollination bioassay showed that prokaryotic expressed recombinant SCR_{13-b} can induce SI response and inhibit cross pollen germination and growth.

Key words: *Brassica oleracea* var. *acephala*; self-incompatibility; prokaryotic expression

芸薹属植物自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 由 S 单倍型上的基因控制 (Bateman, 1955; Nasrallah, 2000), 其中位于 S 单倍型上的 SCR 基因控制花粉的 SI 表型 (Schopfer et al, 1999; Takayama et al, 2000), SRK 基因特异性地在柱头乳突细胞内表达, 控制柱头的 SI 表型 (Stein et al, 1991)。在自交授粉过程中, 同一单倍型的 SCR 蛋白与柱头上 SRK 受体蛋白激酶胞外域特异性地结合, 导致 SRK 胞内激酶域的磷酸化, 通过柱头乳突细胞内的信号级联反应导致自交不亲和 (蓝兴国等, 2004; Murase et al, 2004; Shimosato et al, 2007; Kemp & Doughty, 2007)。

SCR 为花粉覆盖物中一种小的、富含半胱氨酸的分泌蛋白。在目前鉴定的 SCR 中, 氨基酸序列主要由一个信号肽区域和一个成熟肽区域组成 (Schopfer et al, 1999; Takayama et al, 2000; Sato et al, 2003)。成熟肽区域一般由 50 ~ 59 个氨基酸组成, 不同 S 单倍型中的 SCR 蛋白质在成熟肽区域具有高度的序列多态性 (Schopfer et al, 1999; Mishima et al, 2003)。

收稿日期: 2008 - 10 - 27; 修回日期: 2009 - 03 - 19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371189)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lyhshen@126.com)

羽衣甘蓝 (*B. brassica oleracea* var. *acephala*) 是我国北方城市重要的绿化和食用植物 (Li & Yu, 2006)。在前期研究中, 作者从羽衣甘蓝 SI系中鉴定出 $S_{13-b}S_{13-b}$ 单倍型 SI系, 具有较强的自交不亲和性 (蓝兴国 等, 2006)。目前, 虽然已鉴定出 SRK_{13-b} , 但 SCR_{13-b} 序列及其功能尚无报道。本研究利用 RT-PCR的方法分离羽衣甘蓝 SCR_{13-b} 全长编码区序列, 并通过授粉生物活性分析证明 SCR_{13-b} 能够启动 SI反应; 此外, SCR_{13-b} 基因含有一个 758 bp 的内含子; 在 DNA blot 研究中表明 SCR_{13-b} 在 $S_{13-b}S_{13-b}$ 自交不亲和系基因组中只有单一拷贝, 这些研究为进一步探讨 SI 的分子机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 羽衣甘蓝 SCR_{13-b} 的分离

1.1.1 SCR_{13-b} cDNA 的分离

将羽衣甘蓝 $S_{13-b}S_{13-b}$ 自交不亲和系于 2006 年 6 月至 2007 年 5 月种植于东北林业大学花卉生物工程研究所。收集羽衣甘蓝 $S_{13-b}S_{13-b}$ 自交不亲和系植株 2~8 mm 的花蕾, 分离花蕾中的花药, 利用 CTAB 法分别提取花药 RNA (蓝兴国 等, 2006)。RNA 反转录采用的是 AMV 反转录酶 (TaKaRa) 和锚定引物 Oligo (dT)₁₈, 反转录的程序是: 42 °C 孵育 30 min, 99 °C 变性 5 min 和 4 °C 孵育 5 min。

利用 SCR_{13-b} 特异性引物 1 (5'-TAAACAAGAA TTTGCTGCGAG-3') 和 SCR_{13-b} 特异性引物 2 (5'-GAGAACAAC TGA TACTTTG-3') 进行 SCR 全部编码区序列的扩增。 SCR_{13-b} 特异性引物根据甘蓝 SCR_{13} (Schopfer et al., 1999) 的 5' 和 3' 末端编码区设计。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 1 min, 共 35 个循环后, 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。

1.1.2 基因组 SCR_{13-b} DNA 的分离

取羽衣甘蓝 $S_{13-b}S_{13-b}$ 自交不亲和系植株的新鲜嫩叶, 用 CTAB 法提取基因组 DNA (蓝兴国 等, 2006)。以 SCR_{13-b} 特异性引物 1 和 SCR_{13-b} 特异性引物 2, LA Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa) 进行 PCR 反应扩增 SCR_{13-b} DNA 片段。PCR 反应条件为: 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物回收后, 插入到 pBS-T 载体中, 连接产物转化大肠杆菌 Top10 中, 选择阳性克隆进行测序。

1.2 SCR_{13-b} 的 DNA blot 分析

基因组 DNA (6~7 µg), 分别用 *EcoR*、*Xba*、*BamH*、*Hind* 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 HybondTM-N 尼龙膜上; 探针以 SCR_{13-b} 探针引物 1 (5'-GCTAA TCTGA TGA TGCCTTG TGG-3') 和探针引物 2 (5'-TTT TGA CTA A GAC GAA TTT TGA-3') 用地高辛标记获得; 凝胶在变性液 (0.5 mol·L⁻¹ NaOH 和 1.5 mol·L⁻¹ NaCl) 中处理后, 65 °C 水浴锅中进行杂交; 杂交后, 用 2% SSC 和 0.1% SDS 的溶液在室温下将膜洗两次, 每次 5 min; 再用 0.1% SSC 和 0.1% SDS 溶液在 65 °C 洗 30 min, 进行 X 光片显影。

1.3 SCR_{13-b} 重组蛋白质的原核表达及纯化

1.3.1 原核表达质粒 pGEX-KG- SCR_{13-b} 及 pET-32a- SCR_{13-b} 的构建

引物 P1 (5'-GC TCTAGA TAA TCTGA TGA TGCCTTG TGGC-3'), 下划线代表 *Xba* 酶切位点; P2 (5'-GCCAAGCTTCTAACACAATTTACAA TCACA-3'), 下划线代表 *Hind* 酶切位点。及 P3 (5'-CG GGA TC CAA TCTGA TGA TGCCTTG TGGC-3'), 下划线代表 *BamH* 和 P4 (5'-CCGAAGCTTCTAACACAATTTACAA TCAC-3'), 以 pGEM- SCR_{13-b} 质粒为模板, 扩增编码 SCR_{13-b} 成熟蛋白的 165 bp 序列。PCR 反应采用 KOD 高保真酶 (东洋纺), 扩增条件为 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1

min, 共 30 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物回收、双酶切后, 分别插入到 pGEX-KG 载体和 pET-32a 载体中, 连接产物转化大肠杆菌 DH5。重组质粒经 PCR 和酶切鉴定正确后, 进行 DNA 序列分析。

1.3.2 SCR_{13-b} 重组蛋白质的原核表达

将鉴定正确的 pGEX-KG- SCR_{13-b} 、pET-32a- SCR_{13-b} 质粒转化到 BL21 (DE3) pLysS 菌株中。分别挑取单菌落于 5 mL LB 培养基 (含氨苄青霉素) 中, 37 °C 振荡培养至对数期 $A_{600} = 0.6$, 加入终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG), 37 °C 诱导 4 h 后, 进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色进行表达检测。

1.3.3 GST 融合蛋白的纯化

对表达的 pGEX-KG- SCR_{13-b} 菌落以 100 mL 进行大量扩增诱导, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 室温离心 10 min, 收集细菌。将细菌沉淀重悬于 5 mL PBS 缓冲液 ($137 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$; $2.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; pH 7.6) 中, 超声破碎后, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 °C 离心 15 min。取上清液加入用 PBS 缓冲液平衡过的 Poly-Prep chromatography column 层析柱 (Bio-Rad 公司) 中, 再加入 100 μL GST B ind™ 树脂, 4 °C 结合 30 min。用 600 μL PBS 缓冲液洗涤 3 次, 最后用 250 μL 洗脱缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 还原型谷胱甘肽, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$, pH 8.0) 洗脱并收集融合蛋白, 取 10 μL 蛋白质样品进行 12% SDS-PAGE 电泳并进行检测。

1.3.4 His 融合蛋白纯化

对表达的 pET-32a- SCR_{13-b} 菌落以 100 mL 进行大量扩增诱导, 离心收集细菌, 将细菌沉淀重悬于 5 mL 结合缓冲液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-base}$; $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑; pH 8.0), 超声破碎后, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 °C 离心 15 min。取上清液加入用结合缓冲液平衡 Poly-Prep chromatography column 层析柱中, 加入 100 μL Ni-NTA 琼脂糖 (Novagen 公司), 4 °C 结合 30 min。依次用 20、30 和 40 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱缓冲液冲洗 Ni-NTA 琼脂糖, 最后用 250 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱并收集融合蛋白。

1.4 SCR_{13-b} 融合蛋白质的授粉生物活性分析

对 S_{13-b} S_{13-b} 自交不亲和系植株进行自交并与 14 号 (自交亲和系) 花粉杂交授粉。对未散花粉的花进行去雄处理, 在柱头乳突细胞上涂抹约 $0.5 \mu\text{L}$ $600 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 GST- SCR_{13-b} 或 His- SCR_{13-b} 重组蛋白。干燥 1 h 后, 授 14 号花粉。授粉 6 h 后各取 15 个雌蕊, 在 FAA 固定液中固定 24 h。水洗后室温放置在 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 中 20 h。用水冲洗后, 用 0.1% 的苯胺蓝 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{PO}_4$ 缓冲液) 染色 4 h。通过荧光显微镜观察花粉管的生长。

2 结果与分析

2.1 SCR_{13-b} 基因的分离

通过 RT-PCR 的方法获得了羽衣甘蓝 SCR_{13-b} 的 cDNA 序列 (图 1), GenBank 收录号为 EF577028。羽衣甘蓝 SCR_{13-b} cDNA 序列含有 237 bp 的开放读码框 (ORF), 编码 78 个氨基酸的蛋白质。 SCR_{13-b} 蛋白的 N 端含有一个由 24 氨基酸组成的信号肽区域, C 端含有一个由 54 氨基酸组成的成熟肽区域。羽衣甘蓝 SCR_{13-b} 与甘蓝 SCR_{13} 氨基酸的序列 (Schopfer et al, 1999) 比对具有 98.3% 的同源性。

利用 SCR_{13-b} 的特异性引物 1 和 2 通过对基因组 DNA 进行 PCR, 获得 SCR_{13-b} DNA 序列。与 SCR_{13-b} cDNA 序列进行比较发现, 羽衣甘蓝 SCR_{13-b} 基因含有一个 758 bp 的内含子, 内含子 5 供体位点和 3 受体位点边界序列分别是 5'-GU 和 3'-AG, 符合 GU-AG 规则, AT 的含量达到 69.4% (图 1)。

```

TAAACAAGAATTTGCTGCGAGTAAAAGAGAATCTTTAAACACTTTTCTGAATCATGAAAT 60
                                     M K S
CTGCTGTTTATGCTTTATTATGTTTCATATTCATCGTTTCAGGTCATATTCAAGgtacta 120
  A V Y A L L C F I F I V S G H I Q E
ctactacataccctcagctgccactggagctacaattacttgagaaaatttaaactcctc 180
ttcaagtettttccgactaataaaacttttctctcttttttgggctaaacgttagattga 240
taaataaaaattatgaagtgttagacatattctttcaatatgttctgaacttctagcaata 300
gacataggectcgacgtattgcttaatgactttttattggctetaaggccaactccattgg 360
taggttcttaatgggtatcgaaactgattaaaagaatcaaaagaattaagacagaagaaaa 420
agaatcagaagagttttacgcaagaattaagaacaagaaaaagattcaaaaacaatata 480
tatatatatatatatatatattcttgtaatgctagcttttgattcggtaacctgtaccg 540
cttccaatatcactattttctgtttatcagtaaaaagtaaccaatcggatgaactatgtta 600
aatcttcatactatecatcggtttttgcatctatctttttcacatcagttcttgagggt 660
tgcaagaaagtgttctaaactatttttccggcatcaaaatttagatagcatttggcaa 720
aaaaaatttgatagcaaaactcactactaataatcaggaagactatatttgcgaaaagt 780
gggttgtagagcctcggttagtttttaaactatttttaccagttcatctttttatcaa 840
ctaacattttgataattgatatactttaatagAGGTGGAAGCTAATCTGATGATGCCTTG 900
                                     V E A N L M M P C
TGGCTCTTTTATGTTTGGAACTGTCGCAATATAGGAGCCAGGAATGCGAAAAATTAAA 960
  G S F M F G N C R N I G A R E C E K L N
TTCGCCGGGTAAAGCGCAAGAAGCCTTCACATTGCAAATGTACAGATACTCAAATGGGTAC 1 020
  S P G K R K K P S H C K C T D T Q M G T
TTATTCTTGTGATTGTAAATTGTGTAGTAAATGCTAGGTTATATACTAGCTTTATTATC 1 080
  Y S C D C K L C *
ACAACAACCTCTACTTTTTTCTAATCATTCCAAAATTCGTCTTAGTCAAAATAATTGTTTA 1 140
GTTTTTCAGTTTTTTTTTTTTTGACGACAGTTTTAATTTTCTGTTTTAAATTCAAAGTATCA 1 200
GTTGTTCTC 1 209

```

图 1 SCR_{13-b}的核酸序列及推测的氨基酸序列

小写字母表示内含子区域，g和aa分别为供体位和受体位，大写字母表示外显子区域，TAC为终止密码子，核酸序列下排为推测的氨基酸序列。信号肽区域（1~24氨基酸）下划线显示。

Fig 1 Nucleotide sequence of SCR_{13-b} and its deduced amino acid sequence

The intron regions are shown in lowercase letters, with the splice donor/acceptor sequence in frame letters
The exon regions are shown in uppercase letters, with the underlined TAG sequence indicating the stop codon,
and the deduced amino acid sequence is depicted below the nucleotide sequence
The characteristic signal peptide (amino acids 1 - 24) is underlined with a single line

2.2 SCR_{13-b}的 DNA blot分析

为了进一步研究 SCR_{13-b}在基因组中的拷贝数，基因组 DNA 经 *EcoR*、*Xba*、*Hind*、*BamH* 限制性内切酶酶切消化，用 SCR_{13-b} 特异性探针进行杂交，显示出只有单一的条带（图 2），这说明 SCR_{13-b} 在基因组中只存在单一的拷贝。

EcoR *Xba* *Hind* III *Bam*HI

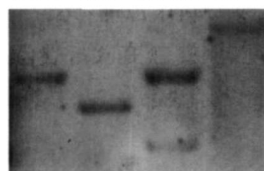


图 2 SCR_{13-b}的 DNA blot分析

Fig 2 DNA blot analysis of SCR_{13-b}

2.3 SCR_{13-b} 重组蛋白的纯化

将构建好的 pGEX-KG- SCR_{13-b} 表达质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 菌株中, 在 37 °C 下 LB 培养基进行细菌培养, 当细菌 OD_{600} 到达 0.6 左右, 加入 IPTG 进行诱导表达。对表达后的细菌进行裂解, 通过亲和层析的方法纯化出一条 32 kD 左右的蛋白条带 (图 3, A)。由于 pGEX-KG 载体表达的 GST 大约 26 kD, 而 SCR_{13-b} 的大小预测 6 kD 左右, 因此, 认为纯化出的条带是目的条带 GST- SCR_{13-b} 。

将 pET-32a- SCR_{13-b} 表达质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 菌株中, 进行蛋白质的诱导与表达。经 Ni^{2+} -NTA 亲和树脂亲和层析纯化后, 在 SDS-PAGE 电泳结果如图 3, B。从图中可以看出纯化得到一个 26 kD 左右的蛋白质条带, 由于 pET-32a 载体本身能够表达一个 20 kD 左右的标签蛋白质, 纯化出的目的条带是 His- SCR_{13-b} 。

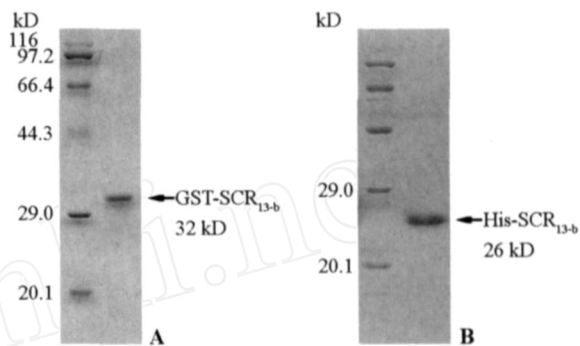


图 3 SCR_{13-b} 重组蛋白的纯化

Fig 3 Purification of recombinant SCR_{13-b}

2.4 SCR_{13-b} 授粉生物活性分析

本研究结果显示 $S_{13-b}S_{13-b}$ 柱头自交授粉, 花粉粒没有萌发和生长 (图 4, A); 利用 14 号花粉给 $S_{13-b}S_{13-b}$ 柱头授粉, 有大量的花粉萌发和生长 (图 4, B); 但经过 GST- SCR_{13-b} 、His- SCR_{13-b} 融合蛋白处理的 $S_{13-b}S_{13-b}$ 柱头上, 14 号花粉几乎没有萌发 (图 4, C、D)。说明 $S_{13-b}S_{13-b}$ 柱头乳突细胞经过 SCR_{13-b} 重组蛋白刺激后产生了 SI 反应, 从而抑制了亲和花粉的正常萌发和生长。

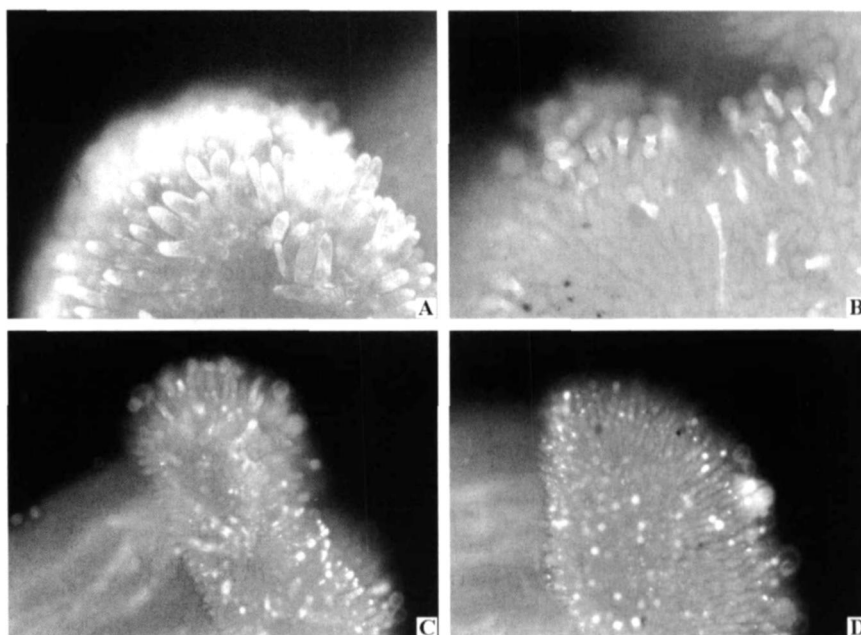


图 4 利用荧光显微镜观察花粉萌发和花粉管的生长情况

A. $S_{13-b}S_{13-b}$ 自交授粉; B. $S_{13-b}S_{13-b}$ \times 14 号杂交授粉;

C. GST- SCR_{13-b} 重组蛋白处理柱头后杂交授粉; D. His- SCR_{13-b} 重组蛋白处理柱头后杂交授粉。

Fig 4 Observation of pollen germination and pollen tube growth by fluorescence microscopy

A. Self-pollination; B. $S_{13-b}S_{13-b}$ \times 14 cross-pollination; C. $S_{13-b}S_{13-b}$ \times 14 cross-pollination

after stigma treated by GST- SCR_{13-b} ; D. $S_{13-b}S_{13-b}$ \times 14 cross-pollination after stigma treated by His- SCR_{13-b} .

3 讨论

本研究获得了一个新的 *SCR* 基因——*SCR*_{13-b}, *SCR*_{13-b} cDNA 序列含有一个 237 bp 的开放读码框, 编码一个 78 个氨基酸的蛋白质。*SCR*_{13-b} 蛋白的 N 端由 24 个氨基酸组成的信号肽区域, C 端由 54 个氨基酸组成的成熟肽区域。在氨基酸的序列比对中, 羽衣甘蓝 *SCR*_{13-b} 与甘蓝 *SCR*₁₃ 具有 98.3% 的同源性。在羽衣甘蓝 *SCR*_{13-b} 基因中含有一个 758 bp 的内含子, 内含子 5 供体位点和 3 受体位点边界序列符合 GU-AG 规则, AT 的含量高达 69.4%。在其它 *S* 单倍型的 *SCR* 中, 同样发现含有一个的内含子, 但长度却存在着很大的差别, 如芜菁 (*B. rassaica rapa*) *SCR*₈ 内含子的长度约 4 kb, *SCR*₉ 约 0.7 kb 和 *SCR*₁₂ 约 0.3 kb; 甘蓝中 *SCR*₆ 约 0.9 kb (Schopfer et al, 1999; Takayama et al, 2000)。通过上述的研究对 *SCR* 基因的结构有了进一步的认识。

授粉生物活性分析是一种快速鉴定 *SCR* 生物活性的方法, 通过在体外进行蛋白质的表达和纯化, 然后对柱头进行重组蛋白的刺激, 如果重组的 *SCR* 蛋白具有生物活性就会启动 SI 反应, 导致亲和授粉的花粉也不能够正常的在柱头上生长 (Takayama et al, 2000; Sato et al, 2004)。本研究获得的羽衣甘蓝重组 *SCR*_{13-b} 能够启动 SI 反应, 干扰或抑制了杂交亲和花粉的正常生长, 这说明了 *SCR*_{13-b} 在 SI 上具有重要的功能。上述研究为更好地理解 “*SCR*” 与 “*SRK*” 这种 “钥匙” 与 “锁” 的关系, 探讨 SI 分子机理的研究奠定了基础。

References

- Bateman A J. 1955. Self-incompatibility systems in angiosperms. Crucifera. Heredity, 9: 52 - 68.
- Kemp B P, Doughty J. 2007. S cysteine-rich (SCR) binding domain analysis of the *B. rassaica* self-incompatibility *S*-locus receptor kinase. New Phytol, 175: 619 - 629.
- Lan Xing-guo, Xie Li-nan, Li Yu-hua. 2004. Progress in study on cell signal transduction self-incompatibility in *B. rassaica*. Chinese Bulletin of Botany, 21: 461 - 470. (in Chinese)
- 蓝兴国, 解莉楠, 李玉花. 2004. 芸苔属自交不亲和细胞信号转导的研究进展. 植物学通报, 21: 461 - 470.
- Lan Xing-guo, Xie Li-nan, Yu Xiao-min, Li Yu-hua. 2006. Selection of self-incompatible line and identification of the *S*_{13b} haplotype from ornamental kale (*B. rassaica oleracea* var. *acephala*). Journal of Beijing Forestry University, 28 (Supp 2): 32 - 39. (in Chinese)
- 蓝兴国, 解莉楠, 于晓敏, 李玉花. 2006. 羽衣甘蓝自交不亲和系的选育及 *S*_{13b} 单倍型的鉴定. 北京林业大学学报, 28 (增刊 2): 32 - 39.
- Li Yuhua, Yu Xiaoyan. 2006. Pollination with laser-irradiated pollens breaks cross-incompatibility between zicaitai (*B. rassaica campestris* var. *purpurea*) and ornamental kale (*B. rassaica oleracea* var. *acephala*) to produce hybrids with the aid of ovule culture. Sci Hort, 108 (4): 397 - 402.
- Mishima M, Takayama S, Sasaki K, Jee J G, Kojima C, Isogai A, Shirakawa M. 2003. Structure of the male determinant factor for *B. rassaica* self-incompatibility. J Biol Chem, 278: 36389 - 36395.
- Murase K, Shiba H, Iwano M, Entani T, Che F S, Satta Y, Ito A, Watanabe M, Isogai A, Takayama S. 2004. A membrane-anchored protein kinase involved in *B. rassaica* self-incompatibility signaling. Science, 303: 1516 - 1519.
- Nasrallah J B. 2000. Cell-cell signaling in the self-incompatibility response. Curr Opin Plant Biol, 3: 368 - 373.
- Sato Y, Fujimoto R, Toriyama K, Nishio T. 2003. Commonality of self-recognition specificity of *S* haplotypes between *B. rassaica oleracea* and *B. rassaica rapa*. Plant Mol Biol, 52: 617 - 626.
- Sato Y, Okamoto S, Nishio T. 2004. Diversification and alteration of recognition specificity of the pollen ligand SP11/SCR in self-incompatibility of *B. rassaica* and *Raphanus*. Plant Cell, 16: 3230 - 3241.
- Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *B. rassaica*. Science, 286: 1697 - 1700.
- Shimosato H, Yokota N, Shiba H, Iwano M, Entani T, Che F S, Watanabe M, Isogai A, Takayama S. 2007. Characterization of the SP11/SCR high-affinity binding site involved in self/nonself recognition in *B. rassaica* self-incompatibility. Plant Cell, 19: 107 - 117.
- Stein J C, Howlett B, Boyes D C, Nasrallah M E, Nasrallah J B. 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *B. rassaica oleracea*. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 8816 - 8820.
- 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 *B. rassaica campestris*. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 1920 - 1925.