

辣椒 *CHS* 基因表达的定量分析及与雄性不育的相关性

陈遥¹, 彭彦¹, 刘峰^{2*}, 张学文^{1*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省农业科学院蔬菜研究所, 湖南 长沙 410125)

摘 要: 为了揭示辣椒胞质雄性不育(CMS)机制,以辣椒胞质雄性不育系 9704A 和其相应保持系 9704B 为材料,对其花蕾转录组进行了 Solexa 测序,经过生物信息学分析鉴别出 1 个花药特异性表达的查尔酮合酶基因(*CHS*),该基因在保持系 9704B 中的表达水平为其对应不育系 9704A 的 16 倍;克隆后的序列比对分析表明,该基因属于 *CHS* 基因家族,与菸草花药特异表达的同源基因 *CHSLK* 的同源性达 90%;用实时荧光定量 RT-PCR 对 9704A 和 9704B 的根、茎、叶中 *CHS* 基因的表达进行了定量分析,结果表明该基因在 2 种材料的茎中几乎不表达,在 9704B 的根和叶中表达量也极低,证实了在正常情况下该基因只在辣椒花药中有较高水平的表达;对不育系的定量 PCR 结果表明,*CHS* 基因在 9704A 的根和叶中有异常的较高水平表达,结合其在花药中的低表达,推测辣椒不育系中 *CHS* 的异常表达可能与其 CMS 性状相关。

关 键 词: 辣椒;查尔酮合酶基因(*CHS*);定量分析;雄性不育

中图分类号: S641.3; S603.8

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)03-0259-06

The quantitative analysis of *CHS* in *Capsicum annuum* L. and its correlation to male sterility

CHEN Yao¹, PENG Yan¹, LIU Feng^{2*}, ZHANG Xue-wen^{1*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Institute of Vegetables, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: To investigate the molecular mechanism of cytoplasmic male sterile (CMS) in *Capsicum annuum* L., transcriptome Solexa sequencing was conducted on pepper flower buds of the CMS line 9704A and its correspondence homonuclear maintainer line 9704B. A gene that expressed 16 times higher in the maintainer liner 9704A than it is in the CMS line 9704B was identified. The cloned cDNA of this gene showed similarity to Chalcone Synthase Family genes with an overall sequence identity of 90% to *Nicotiana sylvestris* anther-specific gene-*CHSLK*. The expression of the gene in root, stem and leaf of the two peppers are tested by real-time fluorescence quantitative (RTFQ) RT-PCR. The result showed that the expression level of the gene in the stems of the two peppers was barely detectable, and in the root and leaf of the maintainer liner was very low, which confirmed that the gene is highly expressed specifically only in anther under normal condition. But the expression of this gene in roots and leaves of the CMS line 9704A is abnormally high, thus the abnormal *CHS* expression pattern in the CMS line may correlate to the male sterility.

Key words: *Capsicum annuum* L.; chalcone synthase gene (*CHS*); quantitative analysis; male sterility

辣椒是中国的一种重要的蔬菜。利用辣椒雄性不育进行制种是提高辣椒制种效率和降低成本的有效途径。胞质雄性不育(CMS)是细胞质内的遗传

物质决定的不育现象,是高等植物不能形成有功能花粉的遗传方式。由于 CMS 并不影响植株的整体发育,且这种不育性能被逆转^[1-2],因此被广泛应

收稿日期: 2013-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101425)

作者简介: 陈遥(1988—),女,湖南衡阳人,硕士研究生,主要从事细胞生物学研究, kidcome11@126.com; *通信作者, liufengrich@126.com; xwzhang@hunau.net

用到杂交育种中。在植物雄性不育配套系统中,不育系与保持系具有一致的核遗传背景,因此,两者细胞质遗传成分的差异便能解释 CMS 的原因。运用这一原理,目前已鉴定出线粒体中的 *coxII*、*atp6*、*orf456*、*orf507*^[3-5]等与辣椒不育系不育性状相关的基因,但是这些基因如何与核基因相互作用、如何躲避不育恢复基因^[6]的控制、如何使得雄配子失活等具体分子机制还不清楚。

根据不育系与保持系的基因差异可以找出许多植物不育性状的基因,但还有很多植物的不育性状的相关基因未能根据不育系与保持系基因的差异被找到,可能不育性状还与基因表达的差异或表达调控的差异相关。为了深入阐述辣椒 CMS 的分子机制,笔者分别从辣椒不育系 9704A 与其同核保持系 9704B 的花蕾中分离总 RNA,采用 Solexa 法完成了转录组测序。经过序列分析,从不不育系和保持系中查找表达差异较大的基因,其中 1 种类似于查尔酮合酶(*CHS*)的基因在 9704B 中的表达量是 9704A 中的 16 倍。根据其序列设计特异引物,采用 RT-PCR 方法从辣椒中克隆了该基因的 cDNA,同时利用特异引物进行实时荧光定量 RT-PCR 对 2 种辣椒材料不同组织中该基因的表达进行了定量分析,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 供试作物。供试辣椒品种为湖南省农业科学院蔬菜研究所选育的辣椒(*Capsicum annuum* L.)不育系 9704A 和同核保持系 9704B。将种子置于黑土、沙子、蛭石体积比为 1:1:1 的营养钵中,于室内培养,白天 24℃,夜晚 18℃,周期变温,每天光照时间为 16 h。在植株开花期,取根、茎、叶以及成熟即将开放的花蕾,清洁后置液氮中,用于 RNA 提取。

2) 菌株。大肠杆菌 *E.coli* DH5 α , 为湖南农业大学细胞生物学实验室提供。

3) 主要试剂。RNA 提取试剂 Trizol 购于

Invitrogen 公司;cDNA 第一链反转录试剂盒购于 Fermentas 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购于维尔生物公司,pMD18-T 载体购自全式金有限公司。

1.2 方法

1.2.1 辣椒 RNA 的提取

用 Trizol 试剂,按照说明提取辣椒花蕾的 RNA 及根、茎、叶的 RNA。用 DEPC 处理过的水溶解干燥的 RNA,并用光谱检测总 RNA 的完整性。从总 RNA 样品中取 8 μ L,采用 2100 生物分析仪检测 RNA 的完整性。

用 Trizol 法提取辣椒根、茎、叶的总 RNA,分别取 12 μ L 用 Oligo(dT)为引物按照说明书进行反转录。

1.2.2 Solexa 测序及拼接

利用 Dynabeads Oligo (dT)将辣椒花蕾 mRNA 从总 RNA 中分离出来,在高温下用二价阳离子将 mRNA 打碎成小片段。这些小片段 RNA 用逆转录酶和随机性引物各自单独反转录成第一链 cDNA,第二链合成用 DNA 聚合酶 I 和 RNaseH。最后,这些小 cDNA 片段用 Illumina 基因组分析仪进行 Solexa 测序。

测序得到的序列通过 GenBank 和 UniProt 数据库比对,去掉了 *e* 值为 10^{-5} 的序列,得到辣椒的非重复序列。这些非重复序列用 EST Scan^[7]翻译成蛋白质,将翻译出的蛋白质在数据库 InterPro 和 Pfam domain 进行比对。

非重复序列在花蕾中的表达量根据 RPKM 算法^[8]进行计算。

1.2.3 基因表达差异分析

用 Stekel 等^[9]发明的 *R* 统计值分析 9704A 和 9704B 中表达差异显著的基因。

1.3 表达差异显著基因的克隆

根据表达差异显著基因的序列,设计扩增核心区域和全长基因的引物。扩增核心区域的引物为 A-s up(5'-ATGTCAGAGAACAACAAGAATG-3'); A-s down(5'-TTAGAGACTCCTAAGGAGTATGC-3')。

扩增全长序列的引物为 A-s outup(5'-CAACACAAT TATACCAACTTTTC-3') ,A-s outdown(5'-TGGGAT GGTAATTTTAAGAAA-3')。PCR 反应总体积为 25 μ L , 其中 cDNA 模板 1 μ L , 10 μ mol/L 上下游引物 (A-s up/ A-s down 或 A-s outup/ A-s outdown)各 1 μ L , 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L , 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.25 μ L , 10 \times Buffer 2.5 μ L , ddH₂O 18.75 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ; 30 个热循环的参数为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min , 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min(全长基因 50 $^{\circ}$ C 退火) , 72 $^{\circ}$ C 延伸 72 s(全长基因延伸 101 s) ; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物放 4 $^{\circ}$ C 保存。

扩增的 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后用试剂盒回收 将回收的片段 TA 克隆到 pUC18-T , 转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞 , 用蓝白斑筛选 , 选取白色克隆菌进行 PCR 检测后 摇菌提质粒做酶切检测 , 最后将阳性质粒送博尚测序公司进行测序。

1.4 辣椒表达差异显著基因的 RT-PCR 检测

以辣椒不同组织的 cDNA 为模板 ,以辣椒 *actin* 基因作为内标基因同时进行荧光定量 PCR 反应。用于辣椒 *CHS* 基因扩增的引物为 Up(5'-GGACGCGT AATGCTCTACTT-3')和 Dn(5'-AGAACTCTGCTT CCTGGATTG-3')。用于辣椒 *actin* 扩增的引物为 actin-up(5'-GAAGCACCTCTCAACCCTAAG-3') , actin-down(5'-GACCACTAGCATACAAGGAAAG A-3')。

2 结果与分析

2.1 序列拼接分析

高通量测序共测出 9.6×10^7 个序列。这些序列被拼接成了 60 497 个非重复序列 , 平均长度为 520 bp。经过同源性比对 , 有 35 733 个非重复序列翻译出的蛋白质功能研究比较清楚。

进一步计算分析表明 , 有 1 203 个基因在不育系和保持系的花蕾中表达差异显著 , 其中 521 个基因在不育系中表达较高 , 另外 682 个基因在保持系中表达较高 , 这说明辣椒 CMS 可能具有更复杂的机制。

通过计算 , 一种基因在 9704A 的花蕾的 *RPKM*(A)

值为 12.78 , 然而在 9704B 的花蕾的 *RPKM*(B)值为 205.58 , 其 e 值为 0 , 并且 $\log_2(RPKM(A)/PRKM(B))$ 为 - 4.01 , 差异有统计学意义。数据表明 , 在花蕾中 , 这种基因在保持系的表达量是不育系表达量的 16 倍。即这一基因在不育系中的表达显著低于保持系。

将此基因序列在 Genbank 上进行同源性比对 , 发现这个基因为 *CHS* 基因家族的花药特异性表达基因。

2.2 *CHS* 基因的克隆结果

RT-PCR 扩增得到全长为 1 675 bp 的 cDNA 序列。该序列包含 1 个 1 191 bp 的开放阅读框(ORF)、1 个 148 bp 的 5'UTR 和 1 个 336 bp 的 3'UTR。BLAST 显示 , 克隆得到的 cDNA(GenBank 登录号为 KC771254)的核心序列与菸草(*Nicotiana sylvestris*) *CHSLK* 基因(GenBank 登录号为 Y14506 及 Y14507)、番茄 *CHS* 基因(GenBank 登录号为 AC239649)的同源性分别达 90%和 88%。

2.2 蛋白质预测结果

用 NCBI 上的 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对辣椒花药特异表达基因 *CHS* 进行了分析 , 预测的蛋白质序列见图 1。

CHS 基因编码 1 个由 396 个氨基酸组成的蛋白质 , 其相对分子质量为 43 800 , 等电点为 5.65。采用 SignalP 4.1 软件分析得出该蛋白没有信号肽 , 说明该蛋白滞留在合成的细胞内。对该蛋白在细胞内的定位分析显示 , 叶绿体靶向肽值(cTP)为 0.346 , 线粒体靶向肽值(mTP)为 0.171 , 说明该 *CHS* 蛋白更多的定位在叶绿体中。而 *CHS* 也是一种色素合成酶 , 说明辣椒花药特异性表达蛋白 *CHS* 可能还参与辣椒的色素合成。

利用 DNAMAN 对辣椒 *CHS* 的氨基酸序列进行了疏水性分析 , 发现在整个多肽中亲水性氨基酸占的比例较疏水性氨基酸高 , 说明该蛋白质为亲水性蛋白。而在 *CHS* 蛋白家族中 , *CHS* 蛋白属于亲水性蛋白。

对辣椒 *CHS* 基因编码的蛋白质保守结构域的分析表明 , 该蛋白属于 *CHS* 蛋白家族 , 其 N 端和 C 端都与 *CHS* 蛋白家族有极高的同源性 , 蛋白的活性位点和结合位点靠近 C 端。

```

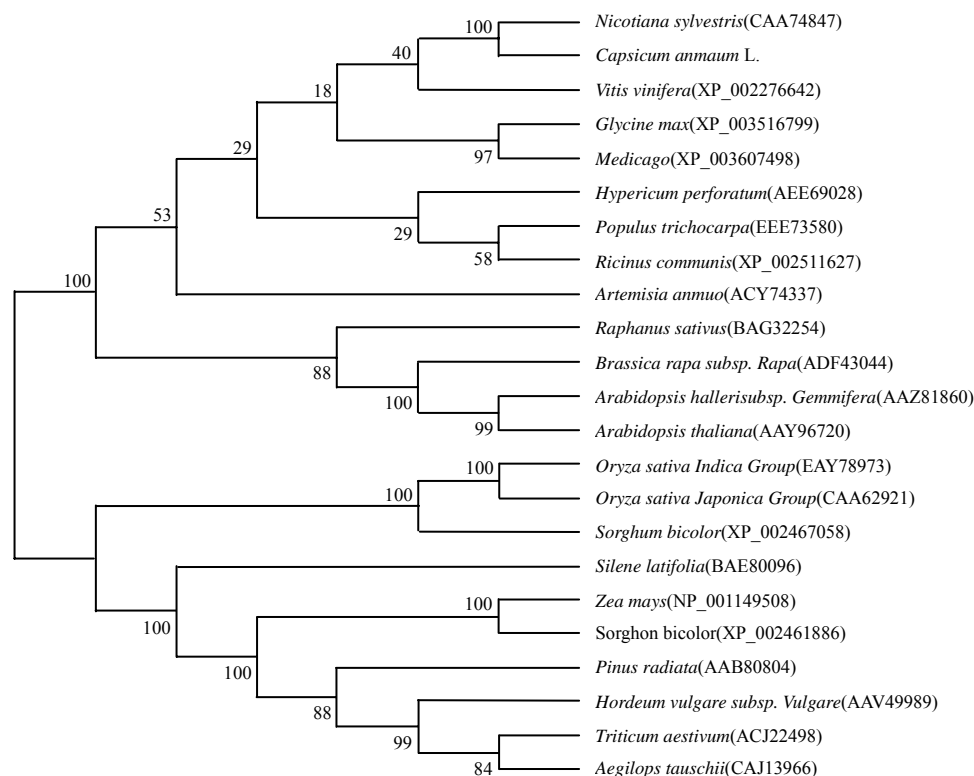
1  atgtcagagaacaacaagaatgttgatgggtgcaactaaccacttttttcaaccatcgcgaa
   M S E N N K N V D G A T N H F F Q P S R
61  cgcttcttactccaggaaaggccactatacttgccatgggcaaggcttttccttcacaa
   R L P T P G K A T I L A M G K A F P S Q
121  ctgcctcctcaggattgcttggtgaaggctacatgcgcgataccaactgtcaagatatg
   L V P Q D C L V E G Y M R D T N C Q D M
181  gcaattaaggagaaattggagcgcctttgcaaaactactactgtgaagacaagatacaca
   A I K E K L E R L C K T T T V K T R Y T
241  gtaatgtcaaaagaaattttggacaagtatccggaactagcggttgaaggcacaccaaca
   V M S K E I L D K Y P E L A V E G T P T
301  atcaatcaaaggctagaaatcggaatccagcagttgttgaaatggcaaaacaagcaage
   I N Q R L E I A N P A V V E M A K Q A S
361  ttagcttgcatgaaggaatggggaagatcaactgatgaaatcactcacattgtttatgtt
   L A C I K E W G R S T D E I T H I V Y V
421  tcatcaagcgaatacgccttaccaggaggtgatcttcaccttgctactgagcttgattg
   S S S E I R L P G G D L H L A T E L G L
481  aggagtgcattggacgcgtaatgctctactttttgggatgttatggtggtgtcacagga
   R S D I G R V M L Y F L G C Y G G V T G
541  cttagagttgccaagatatagctgaaaacaatccaggaagcagagttctgttgacaact
   L R V A K D I A E N N P G S R V L L T T
601  tctgaaactacaattcttggtttttaggccacctaataatgctagaccatacagatctcgtt
   S E T T I L G F R P P N N A R P Y D L V
661  ggcgctgcactttttggcgatggcgctggtgctgtcatagttggaacagaaccaattgtt
   G A A L F G D G A G A V I V G T E P I V
721  gggacagaatctcctttcatggaactgaattttgcattgcagcaattcttgcaggaaca
   G T E S P F M E L N F A L Q Q F L P G T
781  aagaacgtgatcgatgggaggttacagaagaaggataaacttcaaattaggcaggagac
   K N V I D G R L T E E G I N F K L G R D
841  ctccctgagaaaatccaggacaacattgaggagttttgcaagaaactgatagaaaaaggt
   L P E K I Q D N I E E F C K K L I E K G
901  gatcaactgaaggagaccaagtacaatgacttgttttgggctgttcatcccgcgcgaccg
   D Q L K E T K Y N D L F W A V H P G G P
961  gctatacttgacagattggaaggacactcaagttacaaagtgggaaattggattgtagc
   A I L D R L E R T L K L Q S G K L D C S
1021  agaagggcattgatggattatgggaatgtgagtagcaatactatatctatgtgattgaa
   R R A L M D Y G N V S S N T I F Y V I E
1081  tatatgagacaagagttgcagaataagaaagatggtggtgaagaatggggacttgcatta
   Y M R Q E L Q N K K D G G E E W G L A L
1141  gcatttggctcctggcattacttttgaaggcatactccttaggagttctctaa
   A F G P G I T F E G I L L R S L *

```

图 1 辣椒 *CHS* DNA 序列以及推导的氨基酸序列Fig.1 DNA sequence of chili pepper *CHS* and its deduced amino acid sequence

系统进化关系(图 2)显示,辣椒花药特异性蛋白 *CHS* 与来源于双子叶植物的 *CHS* 蛋白家族成员亲缘关系更近,其中与菸草(*Nicotiana sylvestris*)的亲缘关系最近。NCBI 比对结果显示,该蛋白与其他

植物的 *CHS* 蛋白差异也不大,同源性在 74% ~ 92%,进一步说明该蛋白质属于 *CHS* 蛋白家族,同时说明 *CHS* 蛋白家族在进化上是比较保守的。

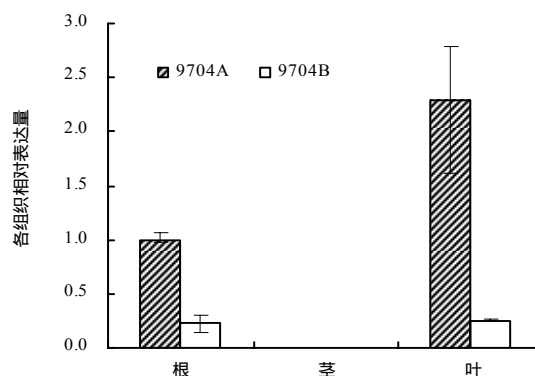
图 2 植物 *CHS* 蛋白质氨基酸序列的进化分析结果Fig.2 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of plant *CHS* proteins

2.3 辣椒 *CHS* 基因在不同组织中的表达

从辣椒不育系 9704A 和保持系 9704B 不同组织中提取总 RNA, 进行 RT-PCR。结果表明, 在辣椒的根、茎、叶中都能检测到 *CHS* 基因片段, 表明该基因在 2 种辣椒的不同组织中都能表达。

从不育系和保持系辣椒的不同组织中提取细胞总 RNA, 荧光定量 RT-PCR 分析表明, 2 种辣椒的茎中 *CHS* 几乎不表达, 而在保持系的根和叶中, *CHS* 基因的表达水平也很低, 结合基因表达差异分析, 得出正常情况下该基因在花药中特异性高表达, 但在不育系的根和叶中的表达却异常升高, 不育系根中 *CHS* 的表达是保持系的 4.5 倍; 不育系叶中 *CHS* 的表达是保持系的 9 倍(图 3)。

结合 Solexa 测序分析结果可知, *CHS* 基因具有一定的表达非特异性, 除在花药中具有高表达外, 在叶和根中也有低水平表达, 而茎中则几乎不表达。但 *CHS* 在不育系根、叶中的表达量则显著高于其在保持系相应组织中的表达, 但在花中的表达量却显著低于保持系; 因此 *CHS* 基因在不育系中的表达是异常的, 进而推测 *CHS* 基因在不育系中的异常表达与辣椒雄性不育性状相关。

图 3 *CHS* 基因在 2 种辣椒根、茎和叶中表达的荧光定量 RT-PCR 分析Fig.3 The RT-PCR analysis of the expression of *CHS* in the root, stem and leaf of 9704A and 9704B

3 讨论

本试验获得的辣椒 *CHS* 基因与查尔酮合酶基因家族(*CHS* gene family)的成员有很高的同源性, 尤其与菸草花药特异表达基因 *CHSLK* 同源性最高, 但其表达并不只特异性地局限于花药, 在辣椒的根、叶中都具有一定的表达量, 但在茎中的表达量极低, 几乎不能检出。有意义的是该基因的表达在不育系和保持系间具有表达模式和水平的差异, 保持系花中的表达量是不育系的 16 倍, 而不育系根

和叶中的表达量分别是保持系的4.5和9倍,表明该基因与辣椒的CMS有关。

查尔酮合酶是形成黄酮类物质起始第一步的催化酶^[10]。玉米和矮牵牛查尔酮合酶基因突变体都是自交不可育的,添加小剂量的山柰酚黄酮醇在培养基上或涂抹柱头都能使得植株恢复育性^[11-13],说明黄酮醇的生物合成及代谢对花粉的发育起了重要作用。黄酮醇是在花药绒毡层细胞合成的^[14],CHS突变体中黄酮醇前体物质累积减少,黄酮类物质在花粉发育过程中补给不足,导致花粉败育^[15]。目前,在小麦^[16]、矮牵牛^[15,17-18]、烟草^[19-21]、水稻^[22]中都相继鉴定出了类查尔酮合酶基因,这类基因都能影响花药黄酮类物质的合成,并特异性地在花药中表达。

本试验分离得到的辣椒CHS基因是CHS家族中的一个基因,根据蛋白结构和表达进化特征,推测该基因在辣椒花药发育过程中起重要作用,但其生理功能和引起不育的具体机制还有待进一步验证。

参考文献:

- [1] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development[J]. The Plant Cell Online, 2004, 16: 154-169.
- [2] Chase C D. Cytoplasmic male sterility: A window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions[J]. Trends in Genetics, 2007, 23(2): 81-90.
- [3] Kim D, Kang J G, Kim S, et al. Identification of *coxII* and *atp6* regions as associated to CMS in *Capsicum annuum* by using RFLP and long accurate PCR[J]. Korean Society for Horticultural Science, 2001, 42(2): 121-127.
- [4] Kim D H, Kim B D. The organization of mitochondrial *atp6* gene region in male fertile and CMS lines of pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Curr Genet 2006, 49(1): 59-67.
- [5] Kim D H, Kang J G, Kim B D. Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated *orf456* gene of chili pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(4): 519-532.
- [6] 唐冬英, 邹学校, 刘志敏, 等. 辣椒胞质雄性不育恢复基因的 RAPD 标记[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 30(4): 307-309.
- [7] Iseli C, Jongeneel C V, Bucher P. EST Scan: A program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences[J]. ISMB-99 Proceedings, 1999: 138-148.
- [8] Mortazavi A, Williams B A, Mccue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [9] Stekel D J, Git Y, Falciani F. The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries[J]. Genome Research, 2000, 10(12): 2055-2061.
- [10] Austin M B, Noel J P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases[J]. Natural Product Reports, 2003, 20(1): 79-110.
- [11] Mo Y, Nagel C, Taylor L P. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen[J]. Plant Biology, 1992, 89: 7213-7217.
- [12] Pollak P E, Vogt T, Mo Y, et al. Chalcone synthase and flavonol accumulation in stigmas and anthers of *Petunia hybrida*[J]. Plant Physiol, 1993, 102: 925-932.
- [13] Taylor L P, Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(3): 317-323.
- [14] Koes R E, Quattrocchio F, Mol J N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution[J]. Bio Essays, 1994, 16(2): 123-132.
- [15] Napoli C A, Fahy D, Wang H Y, et al. White anther: A petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene[J]. Plant Physiology, 1999, 120(2): 615-622.
- [16] Wu S, O'Leary S J B, Gleddie S, et al. A chalcone synthase-like gene is highly expressed in the tapetum of both wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*×Triticosecale* Wittmack) [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 1441-1449.
- [17] Walden A R, Walter C, Gardner R C. Genes expressed in *Pinus radiata* male cones include homologs to anther-specific and pathogenesis response genes[J]. Plant Physiology, 1999, 121: 1103-1116.
- [18] Meer I M, Stam M E, Tunen A J, et al. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility[J]. The Plant Cell, 1992, 4: 253-262.
- [19] Ylstra B, Touraev A, Brinkmann A O, et al. Steroid hormones stimulate germination and tube growth of in vitro matured tobacco pollen[J]. Plant Physiol, 1995, 107: 639-643.
- [20] Yang S, Sweetman J P, Amirsadeghi S, et al. Novel anther-specific *myb* genes from tobacco as putative regulators of phenylalanine ammonia-lyase expression[J]. Plant Physiology, 2001, 126: 1738-1753.
- [21] Atanassov I, Russinova E, Antonov L, et al. Expression of an anther-specific chalcone synthase-like gene is correlated with uninucleate microspore development in *Nicotiana sylvestris*[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 38: 1169-1178.
- [22] 郑宏红, 瞿礼嘉, 刘美华, 等. 花药特异性表达的类查尔酮合酶基因 *D5* 与水稻花粉发育相关[J]. 科学通报, 2000, 45(11): 1132-1138.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维