

利用花药相关基因及启动子创制雄性不育 种质研究进展

杨晓杰^{1,2}, 房卫平^{1*}, 谢德意¹, 周小玲³, 赵元明¹, 赵付安¹, 唐中杰¹, 李付广²

(1. 河南省农业科学院 经济作物研究所, 河南 郑州 450002; 2. 中国农业科学院 棉花研究所,
棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 453000; 3. 郑州市农产品质量检测流通中心, 河南 郑州 450006)

摘要: 杂种优势利用是大幅度提高作物产量、改良作物品质的有效途径, 而作物雄性不育及优良的育性恢复种质是利用杂种优势的关键因素。为此, 综述了近年来有关花药发育重要基因克隆和功能验证研究方面的重要成果, 以及运用植物遗传转化工程创制植物雄性不育种质的进展。同时讨论了利用转基因技术创作物雄性不育系、恢复系和保持系的技术策略, 并对利用植物遗传转化技术创制植物杂种优势利用中“三系”种质的现状进行了分析和展望。

关键词: 雄性不育; 花药发育基因; 遗传转化; 作物育种; 启动子

中图分类号: S334.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)12-0025-05

Research Progress on Production of Male Sterile Germplasm by Genetic Engineering with Anther Developmental Genes or Specific Promoters

YANG Xiao-jie^{1,2}, FANG Wei-ping^{1*}, XIE De-yi¹, ZHOU Xiao-ling³, ZHAO Yuan-ming¹,
ZHAO Fu-an¹, TANG Zhong-jie¹, LI Fu-guang²

(1. Economic Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
2. State Key Laboratory of Cotton Biology, Cotton Research Institute of Chinese Academy of Agricultural
Sciences, Anyang 453000, China; 3. Quality Inspection Center of Agricultural Products in Zhengzhou,
Zhengzhou 450006, China)

Abstract: Heterosis is the effective way of increasing crop yield and improving quality, and diverse germplasm of crop male sterility and fertility restoration is one of the key factors in heterosis utilization. This paper reviews the recent research results of the cloning and functional verification of anther development genes, and the progress of creating crop male sterile and their corresponding fertility restorer germplasm by genetic transformation engineering with the key genes associated with anther development. It also discusses the technical strategy and research priorities of creating plant male sterile lines, and corresponding fertility restore and maintain lines by the plant transgenic technology, as well as the current status and perspective of creating “three lines” in heterosis utilization in practice by plant genetic engineering.

Key words: Male sterility; Anther developmental genes; Genetic transformation; Crop breeding; Promoter

收稿日期: 2011-08-15

基金项目: 国家转基因重大专项(2008ZX08005-001)

作者简介: 杨晓杰(1977-), 男, 河南延津人, 助理研究员, 博士, 主要从事棉花转基因与杂种优势利用研究。

E-mail: yyxxjj7910@sina.com

* 通讯作者: 房卫平(1963-), 男, 河南虞城人, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事棉花育种与分子生物学研究。

E-mail: fangweiping@371.net

杂种优势是生物界普遍存在的现象,表现在杂合体 F_1 代往往比它的双亲表现出更强大的代谢功能,最终体现在生长势、生活力、抗逆性、产量及品质等一种或多种性状优于 2 个亲本。杂种优势利用是大幅度提高作物产量的重要且有效的途径。但目前杂种优势利用方式限制因素较多,主要体现在缺少突破性的不育系和恢复系。长期的作物育种实践表明,突破性成就的取得依赖于特异种质的发现及优良育种材料的创制^[1]。因而,利用包括常规的人工诱变、远缘连续回交核置换,以及现代植物遗传工程技术等多种途径发掘和利用植物雄性不育新种质,谋求植物杂种优势利用中遗传基础的多样化,对促进作物产量、品质及耐逆境能力的不断提高和有效防止病虫害的大流行具有重要的理论和实践意义。近年来,花粉(雄配子)发育生物学研究取得的长足进展为利用植物基因工程技术有目的、高效地创制植物雄性不育种质提供了坚实的基础。在此,着重对国内外花药发育重要基因的克隆、功能特征情况,以及相应利用植物基因工程技术创制雄性不育种质的研究进展做了综述,并对利用植物遗传转化技术创制植物雄性不育系、恢复系等种质的现状进行了分析和展望。

1 植物中花药发育早期过程中的关键基因

花药及花粉发育是一个包括一系列关键事态的十分复杂的生物学过程^[2-3],该过程的任何异常均会导致雄性不育。花药正常发育与花粉育性密切相关,任何引起花药及绒毡层发育异常的突变都有可能引起小孢子发育异常,最终导致花粉败育^[4]。绒毡层处在花药最内层,与发育中的小孢子直接接触,为小孢子发育提供必需的营养和结构物质,在小孢子母细胞向成熟花粉粒发育的过程中起着非常重要的作用^[5]。已有研究表明,植物花粉发育是一个由众多基因参与调控的复杂过程,该过程涉及到近万种特异基因的表达^[6]。譬如,在拟南芥雄配子体发育过程中约有 3 500 个基因表达^[7]。目前,利用分子生物学技术克隆的基因主要来自模式植物拟南芥、烟草以及水稻、玉米等。在此,主要以拟南芥为例,介绍参与花粉囊细胞早期分裂分化,特别是绒毡层特异表达的基因以及这些基因的相互作用,以期利用花药发育基因创造植物雄性不育种质提供理论上的参考。

目前认为,控制雄蕊分化最早期的基因是 *AG* 基因,该基因对雄蕊的产生有着重要作用^[9],而且,

它同时控制着雌蕊和雄蕊的分化^[9]。*AG* 基因诱导雄蕊分化后,雄蕊原基最终在花粉囊中分化出不同类型的细胞,这些细胞受一套非常精细的信号网络调控,从而朝着不同的方向进行分化。该网络中,*SPL/NZZ* 基因是调控小孢子母细胞发生最上游的基因,这 2 个基因的表达被 *AG* 基因在转录水平上诱导激活。*SPL/NZZ* 基因是与 *MADS* 基因相关的细胞核定位基因,属 *MADS-box* 家族,*spl* 突变体表现花粉囊、绒毡层和孢子母细胞的原基发育受阻,缺失药室内壁、中层及绒毡层,从而不能形成正常的花粉囊,最终造成没有孢子母细胞的形成^[10-11]。*BAM1/2* 基因属于富含亮氨酸重复(LRR)的受体类蛋白激酶家族,对初生周缘细胞的分化起重要作用,与 *SPL* 起相互调控作用,以控制小孢子母细胞和体细胞的平衡^[12-13]。*RPK2* 基因在花粉囊发育早期控制中间层细胞的形成,*rpk2* 突变体导致花粉囊在发育晚期发生变形,且不能在缺口处裂开使花粉释放^[14]。野生型拟南芥中,*EMS1/EXS* 在绒毡层前体中表达,而 *TPD1* 在小孢子母细胞的前体细胞中表达,两者通过配体与受体方式结合,进而激活某信号转导路径,最终促使绒毡层和小孢子母细胞的正常发育分化^[15-16],*exs/ems1* 突变体仍然可以形成药室内壁及中层,但缺失绒毡层。同时,药室中产生过量的小孢子母细胞^[17-18]。*SERK1/2* 基因同样属于富含亮氨酸重复的受体类蛋白激酶家族,共同参与控制早期花粉囊细胞向绒毡层细胞分化^[19]。

花药绒毡层形成后,*FAT TAPETUM* 基因是调控花药细胞分化的一个关键调节子,突变体绒毡层和中层细胞在小孢子母细胞减数分裂时期扩大化,最终导致花粉败育。*AtMYB33/65* 基因双突变体表现为绒毡层肥大,小孢子母细胞不能正常分裂,最后导致小孢子母细胞萎蔫降解^[20]。*DYT1* 基因编码 *bHLH* 类转录因子,在花药发育早期的绒毡层细胞中特异表达。*dyl1* 突变体由于绒毡层细胞过度液泡化,从而导致花粉败育^[21]。同样,*AMS* 基因编码一个推测的 *bHLH* 类型的转录因子,*ams* 突变体产生的小孢子由于绒毡层的异常发育而迅速降解消失^[22]。*AtMYB103* 基因隶属于拟南芥 *R2R3MYB* 基因家族,在绒毡层和花药中特异表达,其突变体表现为绒毡层提早退化,进而导致雄性不育^[23]。*MS1* 基因编码一个推测的 PHD finger 转录调控因子,该基因在小孢子母细胞减数分裂完成及小孢子从四分体分离时,在绒毡层细胞中上调表达。*ms1* 突变体由于绒毡层提前解体等异常发育,最终导致小孢子从四分体释放后迅速降解消

失^[24]。

水稻中的 *MSP1* 基因,与拟南芥 *EXS/EMSI* 基因同源,与后者一样,该基因编码一个由 1294 个氨基酸组成的富亮氨酸重复的受体蛋白激酶,具有与 *EXS/EMSI* 基因相似的功能。*mSP1* 突变体表现为过量的大孢子母细胞和小孢子母细胞,花药壁发育异常,并且完全缺失绒毡层^[25]。水稻中另一个与绒毡层发育相关的 *UDT1* 基因,与拟南芥 *DYT1* 基因同源,同样编码一个推测的 bHLH 类型的转录因子,*udt1* 突变体与 *dyt1* 突变体具有类似的表型,小孢子母细胞不能正常发育,最终降解^[26]。*TDR* 基因与水稻花粉发育晚期绒毡层开始降解有关,主要在绒毡层表达。*tdr* 突变体绒毡层和中间延迟降解,小孢子释放后迅速降解,导致完全雄性不育^[27]。*CYP704B2* 基因属于细胞色素 *P450* 基因家族,*cyp704b2* 突变体几乎观察不到角质基质的存在,不正常的油脂代谢影响了绒毡层、小孢子母细胞及花粉壁的合成,最终导致花粉败育^[28]。同样,矮牵牛中的 *TAZ1* 基因及玉米中 *Mac1* 基因,均是与绒毡层发育相关的关键基因^[29-30]。

2 花药特异表达基因及其启动子在不育种质创制中的利用

2.1 雄性不育利用研究中“不育系”种质的创制

利用花药发育必需基因与花药或花粉特异表达的启动子及终止子构建嵌合基因导入受体植株,选择性地破坏花药或花粉,阻断花粉发育,从而导致雄性不育。核酸酶 *Barnase* 基因是解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amylolique faciens*) “RNA 酶/RNA 酶抑制因子”防御系统中发现的 RNA 酶基因^[31]。*Barnase* 酶具有强烈的毒性,可以造成表达该酶的细胞死亡。利用该原理,将烟草绒毡层特异表达启动子 *TA29* 与该基因构成融合基因转化苜蓿,结果表明,*Barnase* 基因的表达破坏了绒毡层细胞,造成花粉发育不良,从而得到雄性不育植株^[32]。

花粉发育过程中小孢子的正常分离需要绒毡层细胞分泌胼胝质酶来降解坚硬的胼胝质。胼胝质壁由绒毡层分泌的 β -1,3-葡聚糖酶所特异分解,进而促使小孢子的正常分离并游离到药室中。由此,将经过遗传修饰的 β -1,3-葡聚糖酶基因与拟南芥绒毡层特异表达启动子 *A3* 构成嵌合基因转化烟草,获得了败育程度多样的雄性不育植株^[33]。

黄酮醇是玉米、烟草等植物中花粉萌发和花粉管生长所必需的,查尔酮(chalcone)是类黄酮生物合成途径中的重要中间物质。利用 *CaMV 35S* 启

动子与反义查尔酮合成酶(chalcone synthase, *CHS*) 基因构成融合基因转入矮牵牛中,转基因植株花药发育异常,导致不能产生有功能的花粉管的白色花粉。显微观察表明,花粉呈白色,从而导致雄性不育^[34]。

rolC 基因可导致植株矮化、节间长度缩短、侧枝增多、花变小、花粉量减少、雄性不育,利用 *rolC* 基因和 *CaMV 35S* 串联成嵌合基因转化马铃薯获得雄性不育植株^[35]。

在高等植物中,线粒体编码的 ATP 合成酶亚基 9 基因的转录产物需要加工后才能形成成熟的 mRNA。分别在 *ATP9* 基因(未加工)和 cDNA(加工)前融合酵母信号肽序列,连接上 *CaMV 35S* 启动子转化烟草,发现转基因烟草植株中形成有功能和无功能的 ATP 合成酶的混合物,从而影响线粒体的功能,最终导致烟草的不育;而对应的 cDNA 转基因烟草完全可育^[36]。

2.2 雄性不育利用研究中“恢复系”种质的创制

利用反义 RNA 技术抑制雄性不育基因的表达,可使雄性不育性状恢复为可育。例如将 *rolC* 的反义基因导入烟草中,再将这种转化植株与导致雄性不育的 *rolC* 基因转化株杂交,杂交后代便恢复了雄性育性^[37]。

利用引起雄性不育基因的抑制基因来恢复育性。例如,根据 RNA 酶/RNA 酶抑制因子防御系统的工作原理,将烟草花药绒毡层特异启动子 *TA29* 与 *Barnase* 酶抑制剂 *Barstar* 的基因构成嵌合基因,转化油菜后,发现获得的转基因油菜育性得到恢复^[38]。2007 年, Ray 等利用 *Barnase/Barstar* 系统互作原理在芥菜中实现了转基因品系杂交种制种^[39]。

2.3 雄性不育利用研究中“不育系”的保持

以转 *Barnase* 基因创制的油菜不育系为例,以未转不育基因的同系品系为保持系,进行授粉保持。由于 *TA29-barnase* 是显性核不育,在其后代中会出现 50% 的可育分离株需要去除。将组成型表达的 *Bar* 基因与 *TA29-barnase* 嵌合基因连接,使得转基因不育系具有除草剂 PPT(phosphinothricin)抗性,而分离出的 50% 可育株则不具备除草剂抗性。因此,在苗期通过喷施除草剂,分离出的 50% 可育株即被杀死,留下的不育系与带有同样抗除草剂基因的恢复系杂交产生 F_1 代种子^[40]。

3 存在的问题与展望

近年来,虽然在花药发育关键基因克隆方面已

取得了诸多成果,但在利用转基因创造雄性不育种质方面的研究依旧比较少。根据花药发育分子生物学原理,利用 RNAi 等分子生物学技术创制植物雄性不育种质的条件已经成熟,但如何实现对不育种质的保持和恢复将是难点和关键。

目前,现有的转基因不育作物种质大多是采用 *TA29-barnase* 不育基因,以 *TA29-barstar* 为恢复基因从而实现杂交种制种。对不育系的保持问题,利用抗除草剂 PPT 的 *Bar* 基因与 *barnase* 不育基因构建嵌合基因,不育系与保持系杂交后代的分离可通过喷洒除草剂 PPT 来鉴别,可育株由于不带有 *Bar* 基因而被去除,从而实现不育系的保持。

利用位点特异性重组技术在基因或染色体水平上对目的基因进行修饰,进而实现对生物性状的遗传改良。利用 Cre/lox 系统工作原理,已成功获得了雄性不育的转基因烟草和育性正常的 F_1 代^[41];同样,在茄子中也实现了不育植株的育性恢复^[42]。可见,利用 Cre/lox 系统可实现不育转基因植物的获得,且 F_1 代恢复育性,该策略同样显示了一定的应用前景。

随着花粉发育分子生物学的深入研究,特别是更多特异转录因子、基因的鉴定,以及质体转基因工程技术的不断完善和发展,可以预期利用基因工程创造雄性不育系和相应恢复系将会在多种作物杂种优势利用上起到越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] 程式华. 杂交水稻育种材料和方法研究的现状及发展趋势[J]. 中国水稻科学, 2000, 14(3): 165-169.
- [2] 李清贤, 陈睿, 杨绍华. 水稻花药发育相关基因研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(4): 44-45.
- [3] Wilson Z A, Zhang D B. From *Arabidopsis* to rice: Pathways in pollen development[J]. Exp Bot, 2009, 60: 1479-1492.
- [4] Sanders P M, Bui A Q, Goldberg R B. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male sterile mutants[J]. Sex Plant Reprod, 1999, 11: 297-322.
- [5] Acini E. Tapetum character states; analytical keys for tapetum types and activities[J]. Can J Bot, 1997, 75: 1448-1459.
- [6] Kamalay J C, Goldberg R B. Regulation of structural gene expression in tobacco[J]. Cell, 1980, 19: 935-946.
- [7] Honys D, Twell D. Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome[J]. Plant Physiol, 2003, 132: 640-652.
- [8] Ito T, Ng K H, Lim T S, et al. The homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2007, 19: 3516-3529.
- [9] Ito T, Wellmer F, Yu H, et al. The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of *SPOROCTELESS*[J]. Nature, 2004, 430: 356-360.
- [10] Yang W C, Ye D, Xu J, et al. The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein [J]. Genes Dev, 1999, 13: 2108-2117.
- [11] Schiefthaler U, Balasubramanian S, Sieber P, et al. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 11664-11669.
- [12] Hord C L H, Chen C D, Young B J, et al. The BAM1/BAM2 receptor-like kinases are important regulators of *Arabidopsis* early anther development [J]. The Plant Cell, 2006, 18: 1667-1680.
- [13] Deyoung B J, Bickel L, Schragek J, et al. The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2006, 45: 1-16.
- [14] Mizuno S, Osakabe Y, Maruyama K, et al. Receptor-like protein kinase 2 (RPK2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2007, 50: 751-766.
- [15] Yang S L, Jiang L X, Puah C S, et al. Over expression of *TAPETUM DETERMINANT1* alters the cell fates in the *Arabidopsis* carpel and tapetum via genetic interaction with *EXCESS MICROSPOROCTES1/EXTRA SPOROGENOUS CELLS* [J]. Plant Physiol, 2005, 139: 186-191.
- [16] Jia G, Liu X D, Owen H A, et al. Signaling of cell fate determination by the TPD1 small protein and EMS1 receptor kinase[J]. PNAS, 2008, 105: 2220-2225.
- [17] Albrecht C, Russinova E, Hecht V, et al. The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES 1 and 2 control male sporogenesis[J]. The Plant Cell, 2005, 17: 3337-3349.
- [18] Colcombet J, Biosson-dernier A, Ros-palau R, et al. *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES 1 and 2 are essential for tapetum development and microspore mutation[J]. The Plant Cell, 2005, 17: 3350-3361.
- [19] Albrecht C, Russinova E, Hecht V, et al. The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES 1 and 2 control male sporogenesis[J]. The Plant Cell, 2005, 17: 3337-3349.
- [20] Millar A A, Gubler F. The *Arabidopsis* *GAMYB*-like

- genes, *MYB33* and *MYB65*, are micro RNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17: 705-721.
- [21] Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, *et al.* Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *DYSFUNCTIONAL TAPETUM1* (*DYT1*) encoding a putative bHLH transcription factor [J]. *Development*, 2006, 133: 3085-3095.
- [22] Sorensen A M, Krober S, Unte U S, *et al.* The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES* (*AMS*) gene encodes a MYC class transcription factor [J]. *Plant Journal*, 2003, 33: 413-423.
- [23] Higginson T, Li S F, Parish R W. *AtMYB103* regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2003, 35: 177-192.
- [24] Wilson Z A, Morroll S M, Dawson J, *et al.* The *Arabidopsis* *MALE STERILITY1* (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors [J]. *Plant Journal*, 2001, 28: 27-39.
- [25] Nonomura K, Miyoshi K, Eeguchi M, *et al.* The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1728-1739.
- [26] Jung K H, Han M J, Lee Y S, *et al.* Rice *UNDEVELOPED TAPETUM1* is a major regulator of early tapetum development [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17: 2705-2722.
- [27] Li N, Zhang D S, Liu H S, *et al.* The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(11): 2999-3014.
- [28] Li H, Piont F, Sauveplane V, *et al.* Cytochrome p450 family member *CYP704B2* catalyzes the ω -hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(1): 173-190.
- [29] Sheridan W F, Golubeva E A, Abrahmova L I, *et al.* The *macl* mutation alters the developmental fate of the hypodermal cells and their cellular progeny in the maize anther [J]. *Genetics*, 1999, 153: 933-941.
- [30] Kapoor S, Kobayasha A, Takatsuji H. Silencing of the tapetum specific zinc finger gene *TAZ1* causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia [J]. *The Plant Cell*, 2002, 14: 2353-2367.
- [31] Hartley R W. Barnase and barstar: two small protein to fold and fit together [J]. *Trends Biochem Sci*, 1989, 14: 450-454.
- [32] Rosellini D, Pezzott M, Veronesi F. Characterization of transgenic male sterility in alfalfa [J]. *Euphytica*, 2001, 118(3): 313-319.
- [33] Worrall D, Hird D L, Hodge R, *et al.* Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco [J]. *The Plant Cell*, 1992(4): 759-771.
- [34] Vander Meer I M, Spelt C E, Mol J N, *et al.* Promoter analysis of the chalcone synthase (*chsA*) gene of petunia hybrid: A 67bp promoter region directs flower-specific expression [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 95-109.
- [35] Spena A, Schmülling T, Koncz C, *et al.* Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants [J]. *The EMBO Journal*, 1987, 13: 3891-3899.
- [36] Hernould M, Suharsono S, Litvaks, *et al.* Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90: 2370-2374.
- [37] Schmulling T, Rohrig H, Pilz S, *et al.* Restoration of fertility by antisense RNA in genetically engineered male sterile tobacco plants [J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 237: 385-394.
- [38] Mariani C, Gossele V, Beuckeleer M D, *et al.* A chimaeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants [J]. *Nature*, 1992, 357: 384-387.
- [39] Ray K, Bisht N C, Pentall D, *et al.* Development of barnase/barstar transgenics for hybrid seed production in Indian oilseed mustard (*Brassica juncea* L. Czern&Coss) using a mutant acetolactate synthase gene conferring resistance to imidazolinone-based herbicide 'Pursuit' [J]. *Curr Sci*, 2007, 93 (10): 1390-1396.
- [40] Denis M, Delourme R, Gourret J P, *et al.* Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassicanaapus* (genetics, morphology, cytology, and sensitivity to temperature) [J]. *Plant Physiol*, 1993, 101: 1295-1304.
- [41] 王勇, 李景富, 林忠平. Cre/Lox P 定位重组系统在植物雄不育和杂种优势中的利用研究 [J]. *分子植物育种*, 2003, 1(4): 557-558.
- [42] Bayer M, Hess D. Restoring full pollen fertility in transgenic male-sterile tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by Cre-mediated site-specific recombination [J]. *Mol Breed*, 2005, 15(2): 193-203.