

大白菜中小孢子胚胎发生相关基因 cDNA 片段的克隆与表达分析

汪维红^{1,2}, 于拴仓², 许明¹, 赵岫云², 张凤兰^{2,*}, 余阳俊², 张德双²

¹沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866; ²北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097

摘要:以易出胚大白菜‘09C3’为材料, 克隆到7个小孢子胚胎发生相关候选基因的cDNA核心片段, 并采用半定量RT-PCR方法研究了这些基因在游离小孢子热激处理和培养期间的表达。结果表明, 获得的7个基因的核心片段长度在213 bp和417 bp之间, 克隆号分别为C31、C33、99H6、99H8、EV14、EX01和C35。NCBI进行Blastn和Blastx分析结果显示, 这些片段与源基因HSP70、BcHSP、Lec 2、Fus 3、PAPI4、HSP17.6和HSP18.2的同源性均超过80%。半定量RT-PCR结果表明, HSP70和Lec 2在热激24 h后上调表达, 而常温培养下24 h后没有变化; BcHSP、HSP18.2、Fus 3和HSP17.6在热激24 h后和常温下24 h都上调表达; PAPI4在热激24 h后和常温下24 h表达下调。

关键词:大白菜; 小孢子胚胎发生; 热激; 半定量RT-PCR

Cloning and Expression Analysis of cDNA Fragments of Genes Related to Microspore Embryogenesis in Chinese Cabbage

WANG Wei-Hong^{1,2}, YU Shuan-Cang², XU Ming¹, ZHAO Xiu-Yun², ZHANG Feng-Lan^{2,*}, YU Yang-Jun², ZHANG De-Shuang²

¹College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; ²Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science (BAAFS), Beijing 100097, China

Abstract: The highly embryogenic inbred line ‘09C3’ was used to clone cDNA fragments of seven candidate genes involving in microspore embryogenesis of Chinese cabbage, and the expression of these genes were studied by semi-quantitative RT-PCR to monitor the effect of 24 h heat-shock and gene behavior after 24 h non-heat-shock culture. The length of seven obtained fragments ranged from 213 bp to 417 bp (the cloning IDs were C31, C33, 99H6, 99H8, EV14, EX01 and C35, respectively). By Blastn and Blastx on the NCBI, these fragments showed over 80% in amino acid identity against HSP70, BcHSP, Lec 2, Fus 3, PAPI4, HSP17.6 and HSP18.2, respectively. The results from semi-quantitative RT-PCR showed that HSP70 and Lec 2 were up-regulated after 24 h heat shock, while no changes were found in normal culture. BcHSP, HSP18.2, Fus 3 and HSP17.6 were up-regulated under both treatments, while PAPI4 was down-regulated.

Key words: Chinese cabbage; microspore embryogenesis; heat shock; semi-quantitative RT-PCR

大白菜游离小孢子培养研究虽然取得了很大进展, 但对小孢子胚胎发生的启动机制、微观发育机制、发育途径以及与之相对应的生理生化及分子机制的研究还很不完善。很多研究(Dias 2001; Touraev等1996)都证明, 预处理能改变小孢子的发育途径, 促使其从配子体发育途径转向孢子体发育途径, 从而诱导小孢子胚胎的形成。在芸薹属作物中, 应用最为普遍的是热激处理, 一般认为32~33℃热激处理1~3 d的效果最好。刘公社等(1995)认为, 在大白菜游离小孢子培养开始时, 12 h的高温处理能大大促进小孢子均等分裂, 24 h的高温处理则能大大提高小孢子胚的诱导率。栗根义等(1993)研究了高温预处理对提高小孢子胚诱导频率的作用, 认为高温热激可改变小孢子发育途径, 阻止小孢子形成成熟花粉粒, 促进其沿胚胎发育途径

发展, 最后形成小孢子胚。因此, 研究和探讨高温预处理诱导白菜游离小孢子培养胚胎发生的机制, 可为提高不同基因型的出胚率提供理论依据, 对加快白菜类蔬菜种质创新有意义。

Seguí-Simarro等(2003)的研究表明, 热激预处理能诱导热激蛋白(heat shock protein, HSP)的积累, 包括HSP70、HSP90和一些低分子量的HSP。经过热激后, HSP70伴随着核蛋白结构在染色质和核仁中出现, 而HSP90只在染色质中出现。小孢

收稿 2009-10-26 修定 2009-11-17

资助 国家农业行业计划(nyhyzx07-007)、北京市科技计划项目(Z09090501040902)和现代农业产业技术体系建设专项资金。

* 通讯作者(E-mail: zhangfenglan@nercv.org; Tel: 010-51503038)。

子胚胎发生过程中,这种HSP的合成导致一些能阻止花粉分化的特异蛋白合成失败,诱导孢子体发育的发生(Telmer等1995)。Volkov等(2005)的研究表明,小分子量的热激蛋白不仅在营养组织中表达,而且在花粉中也表达,其表达量与热激的小孢子胚胎发生密切相关。此外,在甘蓝型油菜、烟草、大麦、小麦和玉米中,一些小孢子胚胎发生早期表达的基因已经得到鉴定。从大麦小孢子培养中已分离了包括非特异的脂质转移蛋白(early culture abundant lipid transfer protein, ECLTP)、谷胱甘肽硫转移酶(early culture glutathione-S-transferase, ECGST)和未知蛋白(如ECA1)在内的差异表达基因(Vrinten等1999)。在甘蓝型油菜中,消减杂交被成功应用于分离早期小孢子胚胎发生基因,发现含有BURP结构域的蛋白与小孢子胚胎发生有关(Hattori等1998)。在拟南芥中,LEAFY COTYLEDON (LEC) 1、LEC 2和WUSCHEL (WUS)基因的过量表达可能导致一些基因型异常或自发的胚胎发生(Ogas等1999)。小孢子胚胎发生是一个复杂的生物学过程,有很多的基因参与这一过程,分离与

鉴定相关功能基因是一项艰巨的任务,还需要做很多工作(Reynolds 1997)。

在大白菜中,关于小孢子胚胎发生分子机制的研究还未见报道。本文针对前人报道的7个与小孢子胚发生相关的候选基因,选用易出胚大白菜‘09C3’为材料,研究这些基因在热激处理和培养期间的表达,以期从分子水平上揭示白菜胚胎发生的机制。

材料与方法

易出胚大白菜‘09C3’(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*),由北京市农林科学院蔬菜研究中心白菜课题组提供。所用试剂除注明外,均为天根生化科技有限公司提供。

用Primer Premier 5.0软件根据候选基因序列设计引物(表1),HSP70、Lec 2、Fus 3和PAP14基因序列来源于甘蓝型油菜(*Brassica napus*),BcHSP、HSP17.6和HSP18.2序列来源于白菜(*Brassica rapa*)。引物均由北京赛百盛基因有限公司合成。

表1 根据候选基因序列设计的引物

Table1 Primer pairs designed from candidate genes

基因	来源	序列号	引物(5' → 3')
HSP70	<i>Brassica napus</i>	ES269567	ATCAACCGAAACACCACCAT ACCATTTGCGTCAATGTCAA
BcHSP	<i>Brassica rapa</i>	AB367955	AGACCTGTATGACCCGTTTCG TTCTCGCTGCTTCTCTCTCC
Lec 2	<i>B. napus</i>	DY021430	TTGCAATGGAATCGTCTTCA ACAGCGATGTTGGGTCACCTT
Fus 3	<i>B. napus</i>	DY012343	GACACGACGGCTCTAACCTC TTTCATATCGGGCATGGATT
PAP14	<i>B. napus</i>	EV141452	TGGGTCGCCTCTCTTCTTTA CCACCAGCGTAACAAAGGTT
HSP17.6	<i>B. rapa</i>	EX017137	CAACATCACGGAAGGACA GGAGGATAAGAACGACACG
HSP18.2	<i>B. rapa</i>	BG544107	TTGGAGGACGGAGATCAAAC CTCATAAACTTCCCGCTTGC

选取长度为2.5~3.5 mm的花蕾(小孢子主要处于单核靠边期),用70%酒精浸泡30 s,2%次氯酸钠溶液洗涤15 min,无菌蒸馏水冲洗3遍。用B₅提取培养基提取小孢子,30 μm无菌微孔纱布过滤,滤液以178×g离心3次,每次3 min。游离的小孢

子用1/2NLN-13(蔗糖浓度为13%)液体培养基培养,用血球计数板调整小孢子浓度为1×10⁵ mL⁻¹~2×10⁵ mL⁻¹。试验分2种处理,每种处理均以未经处理的新鲜小孢子为对照,处理1为33℃热激24 h后取样,处理2为直接进行25℃常温培养24 h后取样。

收集不同处理的小孢子悬浮液, 以 $715\times g$ 离心 2 min, 弃去上清液, 回收小孢子沉淀, 立即置于液氮中研磨, 加入 Trizol 提取 RNA。

采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司) 提取总 RNA。用 RNase Free DNase I (TaKaRa 公司) 处理总 RNA, 去除残留的基因组 DNA。用 Quant Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第一链, 具体步骤参照试剂盒说明。

RT-PCR 扩增候选基因同源片段的反应体系 (10 μ L) 为: 1 μ L cDNA 模板, 1 μ L $10\times$ buffer, 0.75 μ L dNTP, 0.25 μ L Taq DNA 聚合酶, 6 μ L ddH₂O, 上下游引物各 0.5 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。其中不同基因的退火温度不同, *HSP70* 为 53 $^{\circ}$ C, *BcHSP* 和 *Lec 2* 为 55 $^{\circ}$ C, *Fus 3*、*PAP14*、*HSP17.6* 和 *HSP18.2* 为 56 $^{\circ}$ C。PCR 产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。

取 PCR 扩增产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下切下目的条带, 用 DNA 凝胶回收试剂盒 (北京博迈德公司) 回收目的片段。用克隆试剂盒将目的片段重组入克隆载体, 具体步骤参照说明。每条片段随机挑选 3~5 个阳性克隆送天根公司测

序。将测序得到的序列在 NCBI 上应用 Blast 程序进行同源性检索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>); 利用 DNAMAN 软件去除载体序列, 并对基因序列进行比对分析。

以 *GAPDH* 为参照基因, 根据琼脂糖凝胶电泳的结果, 对处理 1 和处理 2 共 4 个时期进行 PCR 扩增 (25 个循环), 调整模板浓度。除 *Fus 3* 外, PCR 扩增时获得的条带均为单一条带; 因为候选基因来源于白菜或甘蓝型油菜序列, 可以直接用原引物序列进行半定量 RT-PCR 检测。对于 *Fus 3*, 用 Primer Premier 5.0 软件设计半定量 RT-PCR 特异扩增引物, 上游引物为 5'-GACACGACGGCTCTAACCTC-3', 下游引物为 5'-ACCCTCGAATGATCCAACCT-3'。针对每个基因设置不同的 PCR 循环数进行半定量 RT-PCR 分析, 其中 *HSP70* 和 *Fus 3* 为 36 个循环, *BcHSP*、*Lec 2*、*PAP14* 和 *HSP18.2* 为 34 个循环, *HSP17.6* 为 29 个循环。

实验结果

1 大白菜胚胎发生相关基因的扩增结果

使用特异扩增引物进行 PCR 扩增的结果见图 1。各引物对均扩增出目的条带, 其产物大小均与

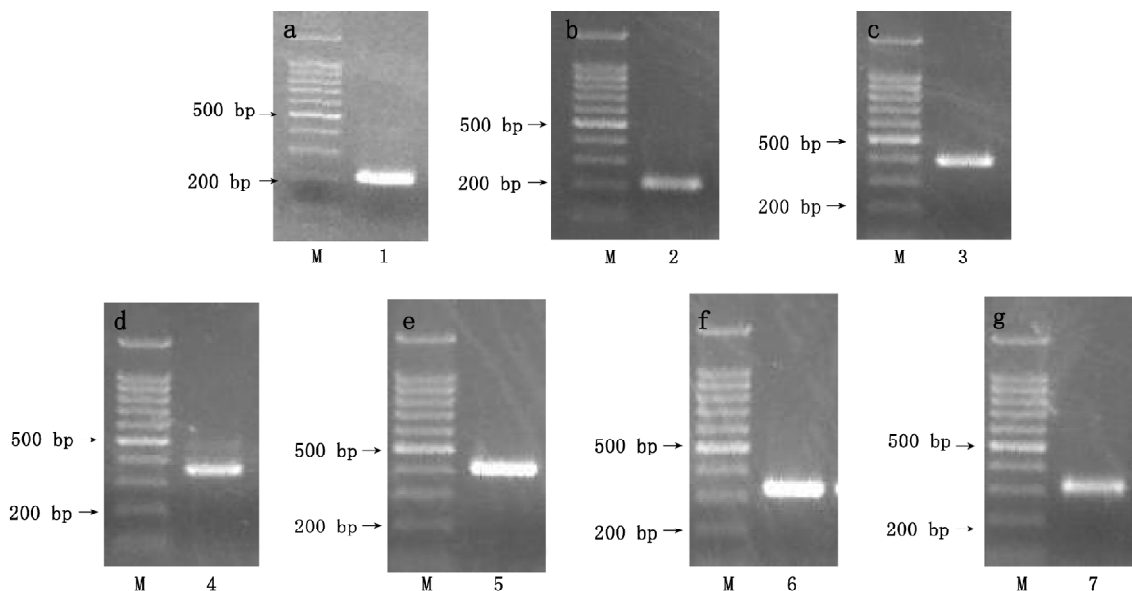


图 1 小孢子胚胎发生相关基因的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR products of microspore embryogenesis genes in Chinese cabbage

M: 100 bp DNA Ladder 分子量标准, 共 11 条带, 由大到小依次是 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200 和 100 bp, 图中标出 500 和 200 bp。1~7: 33 $^{\circ}$ C 热激 24 h 后的 PCR 产物; 克隆号如下, 1: C31; 2: C33; 3: 99H6; 4: 99H8; 5: EV14; 6: EX01; 7: C35。

预期一致,分布在 200 bp 到 400 bp 之间, *HSP70* 和 *BcHSP* 扩增出的条带大小都为 200 bp 左右, 克隆号分别为 C31 和 C33; *HSP18.2* 扩增出的条带为 300 bp 左右, 克隆号为 C35; *HSP17.6* 扩增出的条带为 340 bp 左右, 克隆号为 EX01; *Fus 3* 扩增出的条带为 350 bp 左右, 克隆号为 99H8; *Lec 2* 和 *PAP14* 扩增出的条带都为 400 bp 左右, 克隆号分别为 99H6 和 EV14。除 99H8 外, PCR 扩增产物均为单一条带, 各引物对的特异性较高。

2 大白菜小孢子胚胎发生相关基因的克隆、测序及序列分析

对克隆得到的上述 7 个目的条带进行测序, 去除载体序列后在 NCBI 上进行 Blastn 和 Blastx 分析。Blastn 结果显示(表 2), C31、C33、99H8 和 EV14

与候选基因源序列的核苷酸序列同源性为 100%, EX01 为 99%, 99H6 为 98%, C35 为 91%。Blastx 结果显示(表 3), C33 与 *BcHSP* 的氨基酸序列同源性为 100%, C31 与 *HSP70* 为 97%, EX01 与 *HSP17.6* 为 96%, C35 与 *HSP18.2* 为 92%, EV14 与 *PAP14* 为 88%, 99H6 与 *LEC 2* 为 83%, 99H8 与 *FUS 3* 为 82%。本文获得的基因片段与 7 个候选基因 *HSP70*、*BcHSP*、*Lec 2*、*Fus 3*、*PAP14*、*HSP17.6* 和 *HSP18.2* 的核苷酸序列及其编码氨基酸序列的同源性均超过 80%, 为候选基因的核心片段, 并且蛋白功能已知。7 条序列已提交 GenBank 数据库, 登录号分别为 GT053407 (C31)、GT053408 (C33)、GT053410 (99H8)、GT056058 (99H6)、GT056059 (EV14)、GT056060 (EX01) 和

表 2 差异序列 Blastn 相似性比较

Table 2 Comparison of different sequences by Blastn

克隆号	登录号	片段长度 / bp	Blastn			
			序列 ID	同源性 / %	E 值	相似核酸信息
C31	GT053407	213	ES269567	100	6e-104	甘蓝型油菜 JKBNM4, mRNA 序列
C33	GT053408	222	AB367955	100	7e-109	小白菜 <i>BcHSP</i> , mRNA 序列
99H6	GT056058	399	DY021430	98	0	甘蓝型油菜 63JKCOT5, mRNA 序列
99H8	GT053410	364	DY012343	100	0	甘蓝型油菜 40JKME7D, mRNA 序列
EV14	GT056059	417	EV141452	100	0	甘蓝型油菜早期花药 cDNA, mRNA 序列
EX01	GT056060	339	EX017137	99	8e-168	大白菜花药 cDNA 文库 KBAY-28A08, mRNA 序列
C35	GT056147	328	BG544107	91	3e-129	大白菜幼苗 cDNA 文库 E1889, mRNA 序列

表 3 差异序列 Blastx 相似性比较

Table 3 Comparison of different sequences by Blastx

克隆号	登录号	片段长度 / bp	Blastx			
			序列 ID	同源性 / %	E 值	相似蛋白信息
C31	GT053407	213	BAD94381	97	2e-31	拟南芥 <i>HSP70</i> 类似蛋白
C33	GT053408	222	BAG82627	100	2e-28	小白菜热激蛋白
99H6	GT056058	399	ABE65660	83	3e-18	拟南芥 <i>LEC 2</i> ; DNA 结合 / 转录因子
99H8	GT053410	364	AAC35247	82	2e-08	拟南芥 <i>FUSCA 3</i>
EV14	GT056059	417	AAW29948	88	7e-65	拟南芥 <i>PAP14</i> ; 酸性磷酸酶 / 丝氨酸蛋白 / 苏氨酸磷酸酶
EX01	GT056060	339	NP_180511	96	4e-26	拟南芥 <i>HSP17.6B-CI</i>
C35	GT056147	328	NP_200780	92	1e-43	拟南芥 <i>HSP18.2</i>

GT056147 (C35)。

3 小孢子胚胎发生相关基因的半定量 RT-PCR 检测

根据已获得的 7 个小孢子胚胎发生相关基因

序列设计特异扩增引物, 采用半定量 RT-PCR 方法检测这些基因的表达。7 个基因的表达模式可分为 3 类。(1)只在热激 24 h 后上调表达, 有 2 个基因,

分别为 *HSP70* 和 *Lec 2*。其中 *Lec 2* 只在热激 24 h 后表达, 其它时期不表达。(2)热激和常温培养 24 h 后表达都上调, 有 4 个基因, 分别为 *BcHSP*、*HSP18.2*、*Fus 3* 和 *HSP17.6*。其中 *HSP18.2* 和 *Fus 3* 只在热激 24 h 后和常温 24 h 后表达, *HSP18.2* 在常温下培养 24 h 的表达量要明显高于热激 24 h 后

的表达量, 而 *Fus 3* 在热激 24 h 后的表达量明显高于常温下培养 24 h 的表达量。(3)热激和常温培养 24 h 后表达都下调, 只有 1 个基因, 为 *PAP14* (表 4)。由此推测, 小孢子经过热激或常温 24 h 后, 启动了 *HSP18.2*、*Lec 2* 和 *Fus 3* 的表达, 而对于 *HSP70*、*BcHSP*、*PAP14* 和 *HSP17.6* 来说, 热激

表 4 小孢子胚胎发生相关基因的半定量 RT-PCR

Table 4 Semi-quantitative RT-PCR of genes related microspore embryogenesis

类型	克隆号	基因名称	半定量 RT-PCR 结果			
			H0	H24	R0	R24
热激 24 h 后表达上调	C31	<i>HSP70</i>				
	99H6	<i>Lec 2</i>				
热激和常温培养 24 h 后表达上调	C33	<i>BcHSP</i>				
	99H8	<i>Fus 3</i>				
	C35	<i>HSP18.2</i>				
	EX01	<i>HSP17.6</i>				
热激和常温培养 24 h 后表达下调	EV14	<i>PAP14</i>				
参照基因	-	<i>GAPDH</i>				

H0 和 H24 分别为新鲜小孢子和 33℃ 热激处理 24 h; R0 和 R24 分别为新鲜小孢子和常温培养 24 h。

或常温 24 h 只可诱导表达量的变化。

讨 论

33℃ 热激 24 h 对十字花科植物诱导小孢子胚胎的发生和发育非常重要。经过热激诱导后, 一些小孢子开始对称分裂并转向孢子体途径, 最后形成胚状体。在此过程中, 植物体形成一系列保护蛋白 (如 HSPs) (Boorstein 等 1994)。在这些蛋白中, *HSP70* 家族是最丰富的和进化中最保守的。在甘蓝型油菜小孢子胚胎发生过程中, 热激诱导后的 *HSP70* 家族基因表达上调 (Cordewener 等 1995)。本文在大白菜中也获得类似的结果。Volkov 等 (2005) 的研究表明, 小分子量的热激蛋白不仅在营养器官中表达, 而且在花粉中表达, 其表达量与热激的小孢子胚胎发生密切相关。本文也研究了低分子量的 HSPs, 如 *BcHSP*、*HSP18.2* 和 *HSP17.6*。结果表明, 这些基因不仅在热激 24 h 后表达上调, 而且常温下培养 24 h 后也表达上调。由此推断, 在大白菜小孢子胚胎发生过程中, 不同分子量的 HSPs

可能具有不同的功能, 低分子量的 HSP 可能具有更重要的作用。由于本文取样时间点有限, 这些小分子 HSP 的表达谱还不十分清楚, 有待进一步查明。

LEC 1 编码了一个 CCAAT 框结合转录因子的 HAP3 亚单元 (Lotan 等 1998)。此外, *LEC 1* 的过量表达对诱导营养细胞的胚胎发生有决定性作用 (Stone 等 2001)。*LEC 2*、*ABI 3* 和 *FUS 3* 是包含转录因子的 B3 结构域 (Koornneef 等 1998)。*ABI 3* 和 *FUS 3* 首次被发现参与 ABA 信号途径 (Finkelstein 等 2002)。近年来的研究表明, 这些基因不仅与种子的发育和成熟有关, 还与早期胚胎发生有关 (Gaj 等 2005)。*LEC 1*、*LEC 2*、*FUS 3*、*ABI 3*、*WOX 2*、*WOX 9* 和 *BBM 1* 是小孢子胚胎发生过程中的 7 个标记基因, 而且都是转录因子 (Malik 等 2007)。本文在大白菜中以 RT-PCR 克隆到的 *LEC 2* 和 *FUS 3* 基因片段检测其基因的表达, 结果显示, 它们都为热激 24 h 后上调表达。

紫色酸性磷酸酶 (purple acid phosphatase, PAP) 是活性中心含有双金属核的金属磷酸酯酶 (Schenk

等 2000)。已对真核生物和细菌中的一系列 *PAPs* 基因做了鉴定。在高等植物中, 由于磷酸盐胁迫诱导了许多 *PAPs* 基因的表达, 推断 *PAPs* 在磷酸盐代谢中可能有作用(Li 等 2002)。据报道, 拟南芥衰老叶片中的 *PAP* 还受活性氧胁迫的诱导表达(del Pozo 等 1999)。另外, 还有报道称 *PAP* 在百合花粉粒中也显著表达(Kim 和 An 1996)。本文也克隆出一个 *PAP* 基因片段, 与拟南芥 *PAP* 蛋白高度同源, 半定量 RT-PCR 检测基因的表达表明, 在热激处理后和常温下培养期间游离小孢子中该基因的表达均下调, 究竟此基因在胚胎发生过程中有什么样的生物学功能, 还有待进一步研究。

参考文献

- 栗根义, 高睦枪, 赵秀山(1993). 高温预处理对大白菜游离小孢子培养的效果. 实验生物学报, 26 (2): 165~169
- 刘公社, 李岩, 刘凡, 曹鸣庆(1995). 高温对大白菜小孢子培养的影响. 植物学报, 37 (2): 140~146
- Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA (1994). Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Biol*, 38 (1): 1~17
- Cordewener JHG, Hause G, G6rgen E, Busink R, Hause B, Dons HJM, Van Lammeren AAM, Campagne MMVL, Pechan P (1995). Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. *Planta*, 196 (4): 747~755
- del Pozo JC, Allona I, Rubio V, Leyva A, de la Pea A, Aragoncillo C, Paz-Ares J (1999). A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J*, 19 (5): 579~589
- Dias JCD (2001). Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. *Euphytica*, 119: 389~394
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14: S15~S45
- Gaj MD, Zhang S, Harada JJ, Lemaux PG (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222 (6): 977~988
- Hattori J, Boutilier KA, van Lookeren Campagne MM, Miki BL (1998). A conserved BURP domain defines a novel group of plant proteins with unusual primary structures. *Mol Gen Genet*, 259: 424~428
- Kim SR, An G (1996). Isolation and characterization of a pollen-specific cDNA clone from Easter lily. *J Plant Biol*, 39 (3): 197~202
- Koornneef M, Leon-Kloosterziel KM, Schwartz SH, Zeevaart JAD (1998). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 36 (1-2): 83~89
- Li D, Zhu H, Liu K, Liu X, Leggewie G, Udvardi M, Wang D (2002). Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*: comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *J Biol Chem*, 277 (31): 27772~27781
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MAL, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93: 1195~1205
- Malik MR, Wang Feng, Dirpaul JM, Zhou Ning, Polowick PL, Ferrie AMR, Krochko JE (2007). Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol*, 144 (1): 134~154
- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999). PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (24): 13839~13844
- Reynolds TL (1997). Pollen embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 33 (1): 1~10
- Schenk G, Korsinczky MLJ, Hume DA, Hamilton S, DeJersey J (2000). Purple acid phosphatases from *bacteria*: similarities to mammalian and plant enzymes. *Gene*, 255 (2): 419~424
- Seguí-Simarro JM, Testillano PS, Risueno MC (2003). Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *J Struct Biol*, 142 (3): 379~391
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (20): 11806~11811
- Telmer CA, Newcomb W, Simmonds DH (1995). Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. *Protoplasma*, 185 (1-2): 106~112
- Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E (1996). Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep*, 15 (8): 561~565
- Volkov RA, Panchuk II, Sch6ffl F (2005). Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Mol Biol*, 57 (4): 487~502
- Vrinten PL, Nakamura T, Kasha KJ (1999). Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol*, 41 (4): 455~463