

楸树花粉壁蛋白质提取及特异性

王改萍, 徐 涛, 樊莉丽, 彭方仁, 吕 昕, 陈琳月

(南京林业大学 林学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 为了进一步研究楸树 *Catalpa bungei* 自交不亲和特性, 以楸树不同产地植株云台山楸树(CB-1), 老山楸树(CB-2)和滇楸 *Catalpa fargesii* f. *duclouxii* (CF)的花粉为对象, 利用普通研磨法及超声波破碎法, 研究了适合于花粉壁蛋白质提取的方法。同时采用考马斯亮蓝染色法及聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)比较了不同树种花粉蛋白质质量分数及其主要蛋白质组分。结果表明: 超声波破碎法适于花粉壁蛋白质的提取, 最佳超声参数为功率 400 W, 超声时间 3 s·次⁻¹, 间歇时间 6 s·次⁻¹, 3 个回合, 工作 120 次, 相隔 5 min·回合⁻¹。蛋白质提取液三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)的 pH 7.8 最佳。不同树种的花粉壁蛋白质质量分数表现为滇楸最高, 云台山楸树和老山楸树较低。蛋白质组分研究表明: 各树种花粉共有蛋白质有 26 个, 特异蛋白质为连楸 53.8 kD, 35.0 kD, 23.4 kD, 26.5 kD; 老楸 53.8 kD, 38.5 kD, 23.4 kD; 滇楸 38.5 kD, 26.5 kD。图 6 表 1 参 18

关键词: 植物学; 楸树; 超声波破碎法; 蛋白质; 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

中图分类号: S718.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2016)01-0065-06

Pollen-wall protein extraction and characteristics of *Catalpa bungei*

WANG Gaiping, XU Tao, FAN Lili, PENG Fangren, LÜ Xin, CHEN Linyue

(College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The research was conducted to further reveal the self-incompatibility that exists extensively *Catalpa bungei* and to evaluate the best way to extract pollen-wall protein of *Catalpa*, including the *Catalpa bungei* plants CB-1 from Yuntaishan National Forest Park of Lianyungang and CB-2 from Laoshan Forest of Nanjing and *Catalpa fargesii* f. *duclouxii* (CF) using incorporation and ultrasonication. Also, the content and component of pollen-wall protein from different varieties was compared by the Coomassie Blue Staining Method and SDS (sodium dodecyl sulfate)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Results showed that the relative optimization method to extract pollen-wall protein of *C. bungei* was ultrasonication with the optimal parameters being: ultrasonication at 400 W power for 3 s every 6 s for 3 rounds taking 120 duplications at an interval of 5 min. The optimal pH value to extract pollen-wall protein was pH 7.8 ($F > F_{0.05}$). For pollen-wall protein content, CF was higher ($F > F_{0.01}$) than both CB-1 and CB-2. From the pollen of these three catalpas, 26 proteins were found. Molecular weight of the specific proteins for CB-1 were 53.8 kDa, 35.0 kDa, 23.4 kDa, and 26.5 kDa; for CB-2 they were 53.8 kDa, 38.5 kDa, and 23.4 kDa; and for CF they were 8.5 kDa and 26.5 kDa. [Ch, 6 fig. 1 tab. 18 ref.]

Key words: botany; *Catalpa bungei*; ultrasonication; protein; SDS-PAGE

植物自交不亲和性(self-incompatibility, SI)是指植物的雌蕊柱头或花柱可以辨别自体 and 异体花粉, 并抑制自体花粉萌发或生长的生理现象, 是一种重要的防止植物近亲繁殖、增加变异的遗传机制^[1]。花

收稿日期: 2015-03-02; 修回日期: 2015-06-02

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划子项目(2012BAD21B03); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 王改萍, 从事森林培育及植物生理生化研究。E-mail: wanggaiping@njfu.edu.cn。通信作者: 彭方仁, 教授, 博士, 博士生导师, 从事用材林及经济林的栽培与利用等研究。E-mail: frpeng@njfu.edu.cn

粉与柱头之间的识别和互作是重要的生殖过程，而花粉壁中许多蛋白在此过程中扮演着重要角色。成熟花粉可分为外壁和内壁两部分，两者都含有活性的蛋白质，外壁蛋白已被确定存在于成熟花粉的外壁腔隙内，并参与了花粉与柱头的黏附、识别及花粉水合、萌发等过程^[2-5]。楸树 *Catalpa bungei* 是紫葳科 Bignoniaceae 梓树属 *Catalpa* 的落叶乔木，是中国特有的珍贵优质用材树种和著名园林观赏树种，自古就有“木王”之称^[6-7]。楸树具有自交不亲和特性，已初步确定了其自交不亲和特点、发生位置以及发生类型^[8]。目前，对楸树花粉的研究仅限于其生活力测定及授粉特性等方面^[9-11]。如何有效提取花粉壁内特异蛋白成为研究花粉不亲和机制的基础。本研究以楸树花粉为研究对象，利用超声波破碎细胞法^[12]及普通冰浴研磨法比较了不同蛋白提取方法对花粉壁蛋白的影响，同时以滇楸 *Catalpa fargesii* f. *duclouxii* 花粉为对照材料，比较了不同树种之间蛋白质含量及蛋白质组分的变化特点，为楸树花粉特异蛋白的研究及进一步揭示楸树自交不亲和机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为成年健壮的楸树，分别位于连云港云台山国家森林公园内(简称云台山楸树，CB-1)和南京老山林场内(简称老山楸树，CB-2)，均不能自花结实。对照为滇楸，来自于南京林业大学校内(CF)，能自花结实。各树种均为优良单株。

在楸树盛花期(4月中旬-5月上旬)采集楸树及滇楸各 20 个大花序，带回实验室后用小镊子取下花药，置于称量纸上，室温(24±2)℃下约 2 d，待花药自然开裂后收集花粉，-76℃超低温冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉蛋白质提取方法 ①普通冰浴研磨法。以云台山楸树(CB-1)花粉为材料。取花粉 0.2 g·次⁻¹，按照体积比 1:5 比例加入 0.1 mol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)蛋白提取缓冲液，缓冲液 pH 值共设 3 个水平，分别为 pH 6.8，pH 7.8，pH 8.8。在冰浴条件下充分研磨后，取少量研磨液镜检，其余部分在 4℃条件下静提 5 h，之后离心(4℃，12 000 r·min⁻¹) 30 min，上清液为粗提蛋白液。待上清液吸出后，余下沉淀再按照前述比例加 Tris-HCl 蛋白提取缓冲液，进行 2 次提取。静置及离心同前述条件，离心后，留上清液，去沉淀。之后将上清液分别进行冷冻干燥，超低温储存备用。重复 3 次·处理⁻¹。②超声波破碎法。在冰浴条件下，利用超声波细胞破碎机(南京先欧仪器制造有限公司，XO-1000D)进行破壁处理。超声参数设定共 4 个组合(表 1)，重复 3 次·组⁻¹。超声结束后取少量进行镜检。蛋白提取方法同①。

表 1 超声波破碎花粉粒试验参数

Table 1 Parametrization of ultrasonic waves on extracting proteins from the pollen of catalpas

组合	功率/W	超声时间/(s·次 ⁻¹)	超声间隙/(s·次 ⁻¹)	工作次数
1	400	3	4	40 次·回合 ⁻¹ ，3 回合
2	400	3	6	40 次·回合 ⁻¹ ，2 回合
3	600	3	4	40 次·回合 ⁻¹ ，3 回合
4	600	3	6	40 次·回合 ⁻¹ ，2 回合

1.2.2 蛋白质质量分数测定 采用考马斯亮蓝染色法^[13]。

1.2.3 蛋白质组分测定 电泳研究使用 BIO-RAD 垂直板电泳槽。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，分离胶质量浓度为 0.130 kg·L⁻¹(13.0%)，浓缩胶质量浓度为 0.044 kg·L⁻¹(4.4%)。配胶质量浓度及电泳设计程序参照相关材料，略有变动^[13]。电泳结束后，凝胶用 Bio-Rad Gel Doc XR 成像系统进行扫描，用 Quantity one 软件进行分析。低分子量蛋白质 Marker(Protein Molecular Weight Marker)购自 Fermentas 生物工程有限公司，包括 7 种蛋白质。试验所用药品均为 Amreso 公司进口分装。

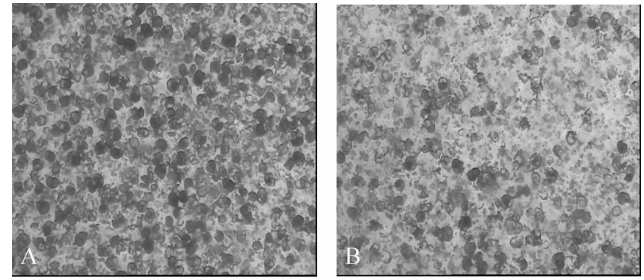
2 结果与分析

2.1 不同花粉蛋白提取方法比较

2.1.1 普通冰浴研磨法提取花粉蛋白 普通冰浴研磨法提取花粉蛋白时，不同研磨时间对楸树花粉壁的破碎性存在差异(图 1)。在研磨 5 min 后的镜检中发现，此时花粉大都保持完整(图 1A)。而研磨 10 min

后, 花粉壁大多消失, 但也出现花粉粒破碎(图 1B), 导致了花粉壁蛋白粗提液中混杂有花粉粒蛋白。普通冰浴研磨法中需要多次镜检, 以观察破碎效果, 耗时较多。而且研磨时使用力量不同, 最终效果也存在差异, 导致研磨时间不确定, 精度也不够, 试验重复性差。

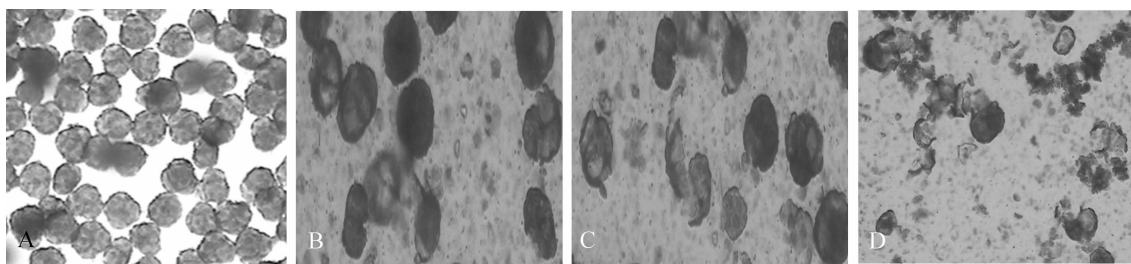
2.1.2 超声波破碎法提取花粉蛋白 利用超声波破碎法提取花粉蛋白的研究表明, 不同的超声参数设计对花粉的破碎存在差异(图 2)。采用第 1 组合超声参数设计破碎花粉, 发现楸树花粉粒保持完整, 花粉壁少量变薄, 在显微镜下仍能观察到花粉壁, 破损率为 0(图 2A)。采用第 2 组合参数后, 发现其花粉壁基本消失, 花粉粒基本完好, 破损率为 5% 左右(图 2B)。而利用第 3 组合参数破碎结束后, 花粉壁基本上消失, 但有少量花粉粒出现破损, 破损率约 15%(图 2C)。采用第 4 组合参数破碎结束后, 其破碎的花粉粒明显多于第 3 组合, 基本上观察不到完整的花粉粒, 花粉破损率约 90%。此时花粉粒中大量蛋白被提取出来, 对花粉壁蛋白的研究造成不利影响(图 2D)。比较 4 种超声波参数组合对花粉的破损影响, 认为第 2 组合更适于楸树花粉壁中蛋白的提取, 能更有效地提取花粉壁蛋白。



A. 研磨 5 min; B. 研磨 10 min。

图 1 常规研磨方法提取花粉蛋白比较

Figure 1 Compare with efficiency on extracting protein by routine method of grinding



A. 第 1 组合; B. 第 2 组合; C. 第 3 组合; D. 第 4 组合。

图 2 不同组合超声波破碎法提取花粉蛋白比较

Figure 2 Compare with efficiency of extracting protein by ultrasonic waves

2.2 不同 pH 值及不同超声功率对花粉蛋白质质量分数的影响

2.2.1 不同 pH 对花粉蛋白质质量分数的影响 采用最佳超声破碎参数设计, 利用不同 pH 值的蛋白提取液(三羟甲基氨基甲烷 Tris-HCl)对老山楸树花粉蛋白质质量分数进行研究(图 3)。结果表明: 提取液的 pH 值不同, 其蛋白提取率存在差异。第 1 次浸提后, 表现为 pH 7.8 的 Tris-HCl 蛋白提取率最高($73.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 而 pH 6.8 提取率最低($52.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), pH 7.8 和 pH 8.8 的浸提液相差不大。方差分析结果也表明: 第 1 次浸提后不同处理间达到极显著差异($F > F_{0.01}$), 但 pH 7.8 和 pH 8.8 之间无论是 0.05 水平及 0.01 水平均不存在差异, 说明这 2 种 pH 值适合于楸树花粉蛋白质的提取。而对第 2 次浸提后蛋白质质量分数的分析表明, pH 6.8 与 pH 7.8 处理间差异不显著, 但两者与 pH 8.8 之间在 0.05 水平存在差异。而第 2 次浸提后蛋白质质量分数显著低于第 1 次, 不同 pH 值条件下蛋白质质量分数在 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 左右, 即第 2 次浸提后获得的蛋白质质量分数占总蛋白量比例低, 认为楸树蛋白一次提取率较高, 可以不进行多次浸提。

2.2.2 不同超声功率对花粉蛋白质含量的影响 不同超声功率对楸树花粉蛋白质质量分数的研究也表明, 在其他超声参数一致的条件下, 超声功率对其蛋白质质量分数有明显影响(图 4)。由图 4 可知: 随着超声功率增大, 花粉蛋白质质量分数明显增加。第 1 次蛋白提取后, 超声功率在 600 W 时蛋白质质量分数(为 $96.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)明显高于功率 400 W 时。方差分析结果也表明: 第 1 次浸提后不同处理之间达到极显著差异($F > F_{0.01}$), 比较第 2 次浸提后花粉蛋白提取率, 发现 2 处理间蛋白提取率均较低, 处理间没有显著差异。对 2 次花粉蛋白浸提叠加值也表现为超声功率为 600 W 时, 蛋白质提取率最高, 但显微镜观察结果表明此处理花粉粒破碎较多, 对楸树壁花粉蛋白的精确性有影响, 因此, 本次试验仍选定超

声功率为 400 W, 保证其花粉特异蛋白的提取及后续的研究。

2.2.3 不同树种花粉蛋白质质量分数及聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 对 3 个样品花粉蛋白质质量分数的研究表明, 滇楸蛋白质质量分数最高, 为 $114.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其次是云台山楸树, 老山楸树质量分数最低(图 5)。进一步比较发现, 滇楸花粉的蛋白质质量分数是老山楸树的 1.58 倍, 而云台山楸树和老

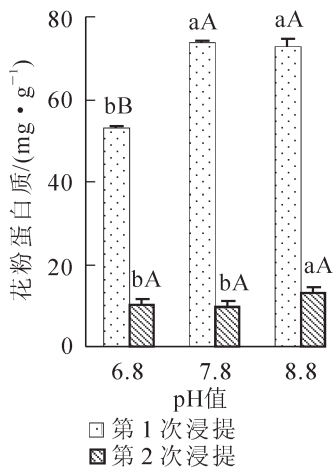


图3 不同 pH 值对花粉蛋白质的影响

Figure 3 Effect of pH on extracting proteins from the pollen

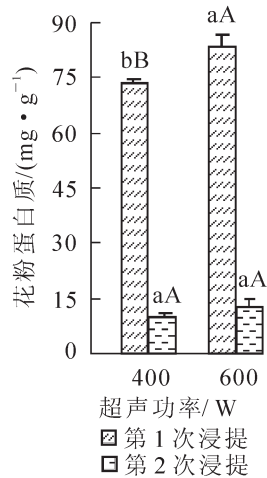


图4 不同功率对花粉蛋白质的影响

Figure 4 Effect of ultrasonic power on extracting proteins from the pollen

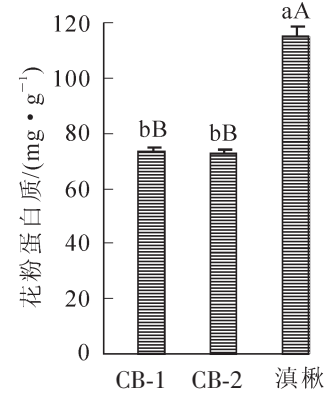


图5 不同样品花粉蛋白质比较

Figure 5 Compare of protein contents of pollen in the different trees

山楸树之间差异较小。方差分析的结果也表明: 不同样品之间存在极显著差异 ($F > F_{0.01}$), 且滇楸与楸树间差异明显。利用 SDS-PAGE 电泳分析了花粉的蛋白质组分(图 6), 结果表明: 花粉蛋白质分子量主要集中在 100 kD 内, 较均匀地分布于不同分子量区域, 分离出的蛋白带约 30 多条, 反映了构成花粉可溶性蛋白的亚基种类较多。对不同样品的蛋白质组分进行比较, 发现三者差异蛋白包括出现在云台山楸树和老山楸树中的 53.8 kD, 23.4 kD 蛋白; 出现在老山楸树和滇楸中的 38.5 kD 蛋白; 出现在云台山楸树和滇楸中的 26.5 kD 蛋白, 云台山楸树中特有的 35.0 kD 蛋白。

3 讨论

植物授粉受精过程的顺利进行对植物生殖生长起着至关重要的作用, 而作为雄配子体——成熟花粉粒的表面物质, 尤其是花粉表面蛋白质则是授粉过程能否顺利完成的关键^[2-3]。了解花粉表面蛋白质组是为了深入研究花粉与柱头黏附识别的分子机制的基础。

花粉壁中蛋白的提取方法普遍采用常规液氮研磨法, 但此次试验表明, 液态研磨法虽然操作简单, 易于进行, 但受研磨时间及人为用力大小不同, 导致花粉壁蛋白与花粉粒中蛋白混杂, 影响楸树中与自交不亲和有关的不亲和蛋白(S蛋白)的研究。而超声波破碎法在天然产物提取中已经显示出越来越多的优势^[14-16]。本研究中, 通过控制一定的超声频率和强度, 能够实现提取楸树花粉壁蛋白的目标。同时, 对蛋白提取液 pH 值的选择中, 发现随 Tris-HCl 浸提液中 pH 值的增大, 各树种花粉内蛋白质质量分数增加, 而且一次性蛋白提取率均较高, 不需要多次浸提分离获得蛋白。

在对植物自交不亲和的研究中, 人们逐步认识到在成熟花粉的外壁和内壁都含有活性的蛋白质, 这种蛋白质是作为雌雄配子体识别的物质基础^[4-5]。MAYFIELD 等^[17]发现 10 个拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 花粉表面蛋白质。刘宝敬等^[18]对甘蓝 *Brassica oleracea* 自交不亲和系及亲和系花粉和柱头蛋白质进行等电聚焦电泳研究中, 发现了 6 条蛋白质谱带仅存在于自交不亲和系中, 而亲和系中未发现此谱带。本研

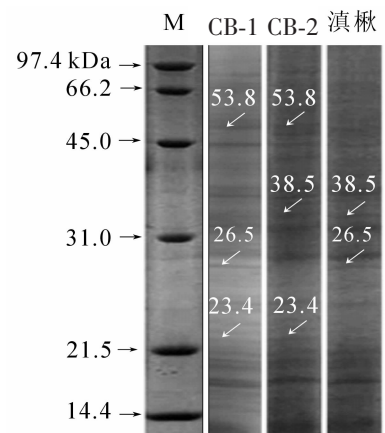


图6 花粉蛋白质 SDS-PAGE 电泳

Figure 6 SDS-PAGE of pollen's protein

究中, 比较楸树和滇楸蛋白质质量分数时发现, 滇楸(CF)的蛋白质最高, 其次是云台山楸树(CB-1), 老山楸树(CB-2)蛋白质最低, 但云台山楸树与老山楸树两者之间没有显著差异。利用 SDS-PAGE 电泳技术对花粉壁蛋白的初步分离, 共分出可辨蛋白带约 30 多条, 主要集中在 100 kD 内, 而 3 样品中存在差异的蛋白质, 包括出现在云台山楸树和老山楸树中的 53.8 kD, 23.4 kD 蛋白; 出现在老山楸树和滇楸中的 38.5 kD; 出现在云台山楸树和滇楸中的 26.5 kD, 仅出现在云台山楸树中的 35.0 kD 蛋白。但本研究仅针对楸树花粉 S 蛋白进行摸索性研究, 电泳分离中获得的各树种特异蛋白是否与楸树自交不亲和有关, 还要通过蛋白的纯化及分离鉴定等作进一步的研究。

花粉的特异性研究将是自交不亲和性研究中的重要内容, 对其特异性蛋白机制的研究可为人工打破植物的生殖障碍, 利用远源基因资源和开发新作物育种途径奠定基础。

4 参考文献

- [1] SIJACIC P, WANG Xi, SKRPAN A L, *et al.* Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility [J]. *Nature*, 2004, **429**(6989): 302 – 305.
- [2] EDLUND A F, SWANSON R, PREUSS D. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination [J]. *Plant Cell Online*, 2004, **16**(supp 1): S84 – S97.
- [3] MURPHY D J. The extracellular pollen coat in members of the Brassicaceae: composition, biosynthesis, and functions in pollination [J]. *Protoplasma*, 2006, **288**(1/3): 31 – 39.
- [4] 王爱云, 李桐, 胡大有. 诸葛菜与芸薹属间花粉与柱头相互作用的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, **32**(3): 232 – 236.
WANG Aiyun, LI Xun, HU Dayou. Pollen-stigma interaction between *Orychophragmus violaceus* and *Brassica* species [J]. *J Hunan Agric Univ Nat Sci*, 2006, **32**(3): 232 – 236.
- [5] 张丞, 王冠, 易素华, 等. 拟南芥花粉表面蛋白质数据的整合[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2009, **38**(5): 511 – 515.
ZHANG Cheng, WANG Guan, YI Suhua, *et al.* Data integration of pollen surface proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Shanghai Norm Univ Nat Sci*, 2009, **38**(5): 511 – 515.
- [6] 张绵. “材”貌绝伦的楸树[J]. 森林与人类, 2003(3): 34 – 35.
ZHANG Mian. “Material” and unsurpassed *Catalpa bungei* [J]. *For & Humankind*, 2003(3): 34 – 35.
- [7] 郭从俭, 钱士金, 王连卿, 等. 楸树栽培[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988.
- [8] 樊莉丽, 彭方仁, 王改萍, 等. 楸树自交及种内、种间杂交亲和性的细胞学观察[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2013, **37**(4): 1 – 7.
FAN Lili, PENG Fangren, WANG Gaiping, *et al.* Cytological observation of fertilization compatibility of *Catalpa bungei* after self, intraspecific cross and interspecific cross-pollination [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2013, **37**(4): 1 – 7.
- [9] 王改萍, 杨红宁, 倪果果, 等. 楸树等 4 种梓属树种花粉离体培养条件的研究[J]. 植物资源与环境学报, 2009, **18**(2): 34 – 42.
WANG Gaiping, YANG Hongning, NI Guoguo, *et al.* Study on in vitro culture conditions of pollens from four tree species of *Catalpa* Scop. including *Catalpa bungei* [J]. *J Plant Res Environ*, 2009, **18**(2): 34 – 42.
- [10] 王改萍, 彭方仁, 徐涛, 等. 几种不同楸树花粉萌发率的测定及花粉超低温保存方法[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, **32**(5): 123 – 126.
WANG Gaiping, PENG Fangren, XU Tao, *et al.* Studies on pollen germination and cryopreservation method in different species of *Catalpa* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2008, **32**(5): 123 – 126.
- [11] 郝明灼, 彭方仁, 王改萍, 等. 楸树人工杂交授粉试验及种实分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, **32**(5): 131 – 134.
HAO Mingzhuo, PENG Fangren, WANG Gaiping, *et al.* Artificial pollination test and analysis of hybrid seed of *Catalpa bungei* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2008, **32**(5): 131 – 134.
- [12] 李惠敏, 秦新民, 覃屏生, 等. 超声波提取沙田柚花粉管可溶性蛋白的初步研究[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2004, **22**(1): 82 – 86.

- LI Huimin, QIN Xinmin, QIN Pingsheng, *et al.* Research on ultrasonic wave extracting proteins from pollen tubes of *Shatinyu* [J]. *J Guangxi Univ Nat Sci Ed*, 2004, **22**(1): 82 – 86.
- [13] 郭红彦, 吴青霞, 彭方仁. 银杏枝条营养储藏蛋白质的组分及动态变化[J]. 林业科学, 2009, **45**(3): 24 – 29.
- GUO Hongyan, WU Qingxia, PENG Fangren. Components and dynamics of vegetative storage proteins in the branch of *Ginkgo biloba* [J]. *Sci Silv Sin*, 2009, **45**(3): 24 – 29.
- [14] 王振宇, 杨春瑜, 金钟跃. 超声波提取芦荟凝胶的工艺[J]. 东北林业大学学报, 2002, **30**(4): 72 – 73.
- WANG Zhenyu, YANG Chunyu, JIN Zhongyue. The technology of abstracting aloe gelatin by ultrasonic [J]. *J Northeast For Univ*, 2002, **30**(4): 72 – 73.
- [15] 徐超, 吴小芹, 林司曦, 等. 马尾松根部蛋白双向电泳分离体系的构建[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2011, **35**(1): 15 – 18.
- XU Chao, WU Xiaoqin, LIN Sixi, *et al.* Establishment of two-dimensional gel electrophoresis system for analyzing the root protein of *Pinus massoniana* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2011, **35**(1): 15 – 18.
- [16] 胡桂萍, 贾宪波, 刘波, 等. 芽胞杆菌菌体蛋白提取方法的比较[J]. 生物技术通讯, 2013, **24**(5): 698 – 671.
- HU Guapan, JIA Xianbo, LIU Bo, *et al.* Comparison of the methods to extract proteins from *Bacillus* spp. [J]. *Lett Biotechnol*, 2013, **24**(5): 698 – 671.
- [17] MAYFIELD J A, FIEBIG A, JOHNSTONE S E, *et al.* Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome [J]. *Science*, 2001, **292**(5526): 2482 – 2485.
- [18] 刘宝敬, 宋明, 李成琼, 等. 等电聚焦电泳测定甘蓝自交不亲和性研究[J]. 西南农业大学学报, 1998, **20**(2): 104 – 110.
- LIU Baojing, SONG Ming, LI Chengqiong, *et al.* Rapid identification of self-incompatibility of cabbage (*Brassica oleracea* L.) with isoelectric focusing [J]. *J Southwest Agric Univ*, 1998, **20**(2): 104 – 110.