

蔬菜作物重要农艺性状相关基因分离的研究进展

余小林¹, 黄科^{1,2}, 曹家树^{1*}

(¹浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029; ²福建省农科院蔬菜研究中心, 福州 350013)

摘要: 本文简要综述了蔬菜作物基因分离的主要方法和近年来蔬菜作物重要农艺性状相关基因分离的研究进展, 指出在分离蔬菜作物目的基因的研究中, 必须加强基因分离的原创性; 充分利用现有的研究条件, 做到基因分离与功能基因组研究相互协调, 均衡发展, 从而为我国蔬菜作物开展分子育种研究奠定基础。

关键词: 蔬菜作物; 基因分离; 农艺性状; 分子育种

中图分类号: S63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-45-06

目的基因的分离是分子生物学研究领域中最为关键和最为重要的环节, 同时也是生物技术应用于生产上创新的源泉。随着基因专利权的建立和完善, 在全球范围内, 从园艺植物中分离重要农艺性状相关基因的竞争也日趋激烈。在这样一个大环境下, 目的基因的分离技术也随着分子生物学发展的步伐而日臻完善和多样化。自1995年以来, 先后完成基因组全序列测定的生物有: 流感噬血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); 2001年2月, 人类基因组序列的工作草图绘制完成并向大众公布; 2002年4月5日, 《科学》杂志用14页篇幅来发表《水稻基因组序列草图》的论文, 这是中国科学家独立完成植物测序工作, 同时也是第一例完成基因组全序列测定的农作物。传统的正向遗传学(Forward genetics)始于突变的表现型, 它提出的问题是“引起生物不同表现型的突变基因序列是什么”。与之相反, 反向遗传学(Reverse genetics)却始于突变体的基因序列, 它所提出的问题是“该序列使生物体的表现型产生了什么样的变化”。即通过在体外改变基因序列来观察体内的遗传效应。随着测序技术的不断提高, 越来越多的动、植物已经或即将完成基因组序列的测定, 遗传学的研究重心正逐渐由正向遗传学向反向遗传学转移, 即由结构基因组的研究转向功能基因组的研究。

一般而言, 植物基因分离的主要目标是识别、分离特异基因并获得基因的完整全序列, 确定其染色体的定位, 阐明基因的生物学功能, 明确其对特定性状的遗传控制关系。蔬菜作物作为重要的栽培植物, 其种类很多, 仅我国就栽培有130多种, 普遍栽培的有50~60种, 同一种类又有许多变种和品种, 其中蕴涵有丰富的特异基因资源。目前常用于蔬菜作物中的基因分离策略和方法主要有以下几种。

1.1 同源序列分离法

植物的种、属之间, 基因编码序列的同源性大大高于非编码区。因此, 如果已经从植物中分离到一个基因, 就可以根据该基因的序列从另一种植物中分离这个基因。分离方法主要有两种, 一是根据基因序列设计一对寡核苷酸引物, 以待分离此基因的植物基因组DNA或cDNA为模板进行PCR扩增, 对扩增产物测序并与源基因进行序列比较, 从而确定该基因是否为待分离基因。肖岗等^[1]采用此方法获得了山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因; 王淑芳等^[2]从*E. coli* TG1菌株中扩增得到胆碱脱氢酶基因, 并对番茄进行了遗传转化。另一种方法是用已知序列的基因制备探针, 筛选待分离基因的植物核DNA或cDNA文库。再对阳性克隆进行测序, 并与已知基因序列进行同源性比较, 最后经转化鉴定是否为待分离的基因。应用该法已成功分离了许多植物基因, 如Xu等^[3]从*Solanum chacoense*中分离出两个

自交不亲和基因; Weigel 等^[4]从拟南芥中分离得到 *LEAFY* 基因; 杨素欣等^[5]根据大白菜 *BcpLH* 基因设计引物, 用 PCR 法从结球期的甘蓝茎尖组织扩增到 *BcpLH* 基因的同源基因 *BoLH1*; 曹必好等^[6]根据抗病基因保守序列 (NBS-LRR) 设计简并引物, PCR 扩增得到探针, 经筛选 cDNA 文库后获得一个编码 226 个氨基酸, 包含 681bp 的开放阅读框架的与结球甘蓝抗 TuMV 相关的基因。除此之外, 利用植物基因组全序列测定的结果, 借助计算机找出所有可能的开放阅读框架(ORF), 最终可以克隆到植物体的全部基因。

1.2 差异表达分析法

1.2.1 mRNA 差异显示法(mRNA differential display, DD-PCR) 该方法是由美国哈佛医学院的Liang和Pardee^[7]首先提出的, 其基本原理是 RNA- 逆转录-PCR。真核生物成熟 mRNA 3' 端 poly(A) 尾上游的 2 个碱基有 12 种组合, 而 poly(A) 尾上游的 1 个碱基仅有 3 种组合(T, G, C)。因此, 按照碱基互补原则人工合成 poly(T), 在其 3' 端加上另两个或一个碱基, 用此引物进行逆转录成 cDNA, 并用此引物锚定 cDNA 的第二链的 3' 端, 同时, 用另一随机寡核苷酸引物(10bp 的随机引物)与 cDNA 第一链互补进行 PCR 扩增。随后将扩增产物进行电泳、染色或扩增时用同位素标记, 差异的 cDNA 片段重扩增后回收进行克隆分析, 利用 RACE(rapid amplification of cDNA ends)技术或对 cDNA 文库筛选获得待测基因的全长。本实验室利用 DD-PCR 方法, 结合 RACE 技术, 从白菜核雄性不育两用系中分离并克隆到一个与白菜核雄性不育相关的编码细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)基因 *CYP86MF*, 经 Northern 验证表明, 该基因在白菜两用系不育株的表达受到了明显地抑制, 并且该基因在花蕾中特异表达, 而在叶片和茎中不表达^[8]。随后, 根据 GenBank 登录的同源序列保守区设计引物, 在萝卜、芜菁、芥菜、甘蓝、大白菜、油菜、荠菜以及拟南芥等十字花科栽培植物的基因组 DNA 中均扩增出 *CYP86MF* 基因的同源序列, 其中芜菁和甘蓝的同源序列与 *CYP86MF* 基因的同源性达 90% 以上。

1.2.2 cDNA-AFLP 分析法 该方法主要用来分析基因的差异表达及检测差异表达的基因, 其基本原理及主要步骤如下: 分别提取差异表达的总 RNA, 逆转录并合成 cDNA 第二链, 随后用限制性内切酶水解 cDNA 双链产生不同大小的 cDNA 片段, 再在

片段的两端连接上人工寡核苷酸接头, 制成模板 cDNA; 然后用含选择性碱基的引物对模板 cDNA 进行选择扩增; 最后, 凝胶电泳检测扩增产物, 根据扩增片段长度的不同检出多态性。从电泳胶上切下差异片段, 再扩增后进行克隆分析, 采用 RACE 技术或制备探针从 cDNA 文库或基因组文库中筛选出全长的基因。目前, 我们实验室采用 cDNA-AFLP 方法配合 RACE 技术, 从白菜核雄性不育两用系中获得四个与白菜雄性不育相关的基因全长 *BCA1*, *BCA2*, *BCA3* 和 *BCA4*。经 BLAST 序列比较, *BCA1* 和 *BCA2* 没有发现同源序列, 说明获得的全长序列可能是新基因(结果待发表)。

1.2.3 减法杂交 该方法于 1991 年由 Lee 等首先提出, 其原理是植物在生长发育过程中不同组织或同一组织的不同发育阶段, 由于基因特异性的表达, 其 mRNA 表现不同, 从表达特异基因的组织中提取 mRNA, 并逆转录成 cDNA。随后从无特异表达的组织的 mRNA 中提取 mRNA, 两者杂交, 而特异 mRNA 转录的 cDNA 仍保持单链状态, 把这种单链 cDNA 分离出来即为差异表达基因。Chong 等^[9]分离了小麦的春化相关基因; 余旭红等^[10]构建了大白菜包心早期茎尖组织特异的 cDNA 文库, 分别与莲座叶和包叶 cDNA 两个探针进行差异杂交, 筛选出一个全长的 cDNA 克隆 *BcpLH*, 据推测该基因以双链 RNA 结合蛋白的形式在包叶的形成和球叶的发育过程中起作用。

1.3 功能分离法

功能分离法是一种经典的基因分离策略, 它根据性状的基本生化特性这一功能信息, 在鉴定已知基因的功能后进行分离。利用这种方法分离基因首先应根据已知的生化缺陷或特征确认与该功能有关的蛋白质, 再分离纯化这一蛋白并制备相应抗体, 或测定其氨基酸序列, 推测可能的 mRNA 序列, 根据 mRNA 序列设计相应的核苷酸探针或寡核苷酸引物。利用抗体或核酸探针筛选核 DNA 文库或 cDNA 文库, 也可利用寡核苷酸引物对基因组 DNA 或 cDNA 进行 PCR 扩增。通过对阳性克隆或 PCR 扩增产物的序列分析鉴定分离基因。利用这种方法已经分离到第 1 个自交不亲和的 *S* 基因^[11], 冯洁和何礼远等^[12]首次从马铃薯近缘栽培种富利亚的杂交后代材料 MS-42.3 中发现并分离纯化了一种抗青枯菌蛋白(命名为 Apl), 并进一步获得了 API 蛋白的编码基因。

1.4 转座子或 T-DNA 标记法

转座子是从一个基因位置转移到另一个位置的DNA片段,通过转座子上的标记基因(如抗药性等)就可检测突变基因的位置和分离突变基因。目前,研究得较为深入的有Ac/Ds、En/Spm、Tam、Mu等转座子。转座子标签法分离基因需要创建转座子插入突变库,并进行筛选鉴定,这项工作需要投入大量人力物力,目前已经建立了拟南芥和水稻的突变基因库。其中番茄的抗叶霉病基因Cf-2和Cf-9就是采用转座子标记法分离得到的^[13]。

与转座子功能类似的根癌农杆菌T-DNA也可用来分离植物基因。T-DNA能够从农杆菌中转移并稳定地整合到植物宿主的基因组中,从而使整合位置上的基因失活或产生突变。通过T-DNA上的标记基因(如NPTII或GUS等基因)就可检测突变位置,得到与T-DNA相连的DNA片段。以此制备探针筛选野生型基因文库,就可得到与突变相应的完整基因。目前,该方法已成功应用于拟南芥、烟草等有关基因的分离。同样,T-DNA标记法也需要建立相应的突变体库。目前,本实验室正利用含多个CaMV35S启动子的超强表达载体构建芸薹属蔬菜的突变体库,期望能获得一些重要农艺性状相关的目的基因。

1.5 定位克隆

定位克隆(Positional cloning),又称为图位克隆。1985年首先由剑桥大学的Alan Coulson提出,该方法的基本思路是根据功能基因在基因组中都有相对较稳定的基因座,在利用分离群体的遗传连锁分析或染色体异常将基因定位到染色体的一个具体位置的基础上。通过构建高密度的分子连锁图,找到与目的基因紧密连锁的分子标记,不断缩小候选区域进而克隆该基因,并阐明其功能和作用机制。迄今为止,用定位克隆技术分离得到的植物基因已超过了50个,其中,Martin等^[14]最早用定位克隆技术分离出番茄的*pto*基因,并将该基因导入感病的番茄品系,从而使植株获得了对丁香假单胞菌的抗性。

除上述分离基因的方法以外,还有表型分离方法和人工合成方法等等。基因分离的技术发展很快,但每一种方法都有它的优势和劣势及适用范围等限制因素,因而我们必须根据所分离基因的类型和实际条件选择最佳的方案。

2 蔬菜作物重要农艺性状相关基因的分离

由于蔬菜作物中蕴涵有丰富的特异基因资源,近年来,随着分子生物学实验手段的不断完善和模式植物拟南芥全序列的测定完成,从蔬菜作物中分离和克隆重要功能的基因在世界范围内也方兴未艾,获得了一批重要农艺性状基因,如高产、优质、抗病、抗逆、雄性不育、自交不亲和以及具有重要生理功能的基因,并进一步应用于新品种选育、不育材料的获得和有用生物物质的生产等方面的开发利用。近年来,从蔬菜作物中分离得到的上述几个重要农艺性状相关基因列表如下(表1)。

3 我国蔬菜作物分离目的基因现存的问题及其研究展望

我国是许多温带、亚热带作物的起源地,也是世界农业最古老的发源地和园艺植物起源的巨大中心,而且蔬菜作物是园艺作物中数量最大,类型最多的植物种类,因此其中蕴涵有丰富的基因资源。同时,从园艺植物中分离重要功能基因并进行功能分析鉴定已经成为当前植物前基因组学向植物后基因组学过渡期间一个十分引人注目的研究热点。目前,随着拟南芥和水稻等基因组计划的完成,针对蔬菜作物基因组序列的测定水平有了很大的提高,然而随着我国蔬菜作物目的基因的分离研究日渐增多的同时,也出现了一些制约本领域持续健康发展的瓶颈问题,主要表现在以下三个方面:

3.1 基因分离技术的相对落后

当前,在蔬菜作物中一般多以同源序列扩增法进行同源基因的分离,这与蔬菜作物本身的特点有着密切的关系。由于蔬菜作物的种类繁多,单个种类的栽培面积有限,有些珍稀特种蔬菜相对水稻、小麦、玉米以及油菜等大宗作物而言其栽培面积几乎可以忽略不计,难以引起决策者和研究者的重视,因此,投入蔬菜作物中的研究资源相对较少,这同时也是造成蔬菜作物中基因分离技术相对落后最主要的原因之一。目前不仅没有一种蔬菜作物列入植物基因组计划,得到其全长序列,就是分离目的基因的基础工作——基因组文库的构建,在蔬菜作物中也很少。所以,要从蕴涵有丰富基因资源的蔬菜作物种类中分离得到有用的目的基因,一方面要引起决策者的重视,进一步加大研究资源的投入;另一方面也要提高研究者自身的积极性,充分利用现有的研究资源,深入开展此方面的研究工作,为以后大规模分离蔬菜作物重要农艺性状的相

表1 蔬菜作物重要农艺性状相关基因的分离

基因来源植物	基因名称	基因的表型 (或功能)	参考文献
结球甘蓝	<i>BoLH1</i>	包叶的形成和球叶的发育	[5]
结球甘蓝	<i>TuR2</i>	抗芜菁花叶病毒 (TuMV)	[6]
结球甘蓝	<i>SLG, SRK, SCR</i>	自交不亲和	[11,16~18]
花椰菜	<i>BobCAL</i>	与花球发生有关	[15]
大白菜	<i>BcpLH</i>	包叶的形成和球叶的发育	[10]
普通白菜	<i>CYP86MF</i>	可能与育性相关	[8]
普通白菜	<i>BCMF1, BCMF2, BCMF3, BCMF4</i>	待定	待发表
普通白菜	<i>SP11</i>	自交不亲和	[19]
芥菜、油菜、拟南芥	<i>FAE 1</i>	脂肪酸延长酶	[20]
萝卜	ATP酶 β 亚基	光合作用	[21]
辣根	<i>HRP-C</i>	辣根过氧化物酶同工酶C	[22]
番茄	<i>Cf-2, Cf-6</i>	抗叶霉病-2, 抗叶霉病-9	[13]
番茄	<i>pto</i>	抗细菌性斑点病	[14]
番茄	<i>TAO1, TAO2, TAO3</i>	乙醛氧化酶	[23]
番茄	<i>TAO4, TAO5</i>	拟乙醛氧化酶	[23]
番茄	<i>NR</i>	延迟成熟	[24]
马铃薯	<i>Ssci17, Ssci20</i>	抗冷害	[25]
马铃薯	<i>apl</i>	抗菌蛋白	[12]
辣椒	<i>CaPinII</i>	蛋白酶抑制因子	[26]
辣椒	<i>Chi3-P1</i>	几丁质酶III	[27]
茄子、拟南芥	<i>Afgrp-5</i>	与体细胞胚发育有关	[28]
菜豆	<i>DnaJ-like</i>	抗逆性	[29]
豌豆, 向日葵	<i>Actin</i>	肌动蛋白基因	[30~31]
豌豆	<i>AAIR</i>	乙酰羟酸还原异构酶	[32]
大豆	<i>Leginsulin</i>	豆类胰岛素	[33]
丝瓜	<i>luffin-b</i>	植物核糖体失活蛋白	[34]
苦瓜	<i>moc PHGPX</i>	谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶	[35]
草莓	<i>annfaf</i>	膜联蛋白	[36]
葱莲	<i>Lectin</i>	可能与抗虫有关	[37]
金花菜	<i>CPAII</i>	氨甲酰磷酸合成酶	[38]
籽粒苋	核糖体蛋白 <i>S25, AmMT</i>	蛋白质合成, II型金属硫蛋白(耐重金属)	[39~40]
榆钱菠菜	<i>AhProT1</i>	脯氨酸转运蛋白	[41]

关基因奠定研究基础。

3.2 跟踪研究居多, 原创性成果较少

近年来, 虽然我国在植物基因组研究工作中取得了令人瞩目的成绩, 尤其在水稻基因组计划研究中处于国际领先水平, 然而, 遗憾的是, 目前我国在植物基因的分离方面还是以跟踪研究居多, 这在一定程度上是造成我们在植物基因分离研究领域总处于追踪世界先进水平局面的主要原因。作为栽培面积相对较小的蔬菜作物而言, 其研究境况自然不言而喻。要摆脱这一不利的现状, 唯一的出路就是加强原创性成果的研究力度, 从而在新世纪的分离目的基因的竞争中抢占先机, 充分发挥我国蔬菜作物起源种质最多的资源优势。

3.3 基因的生物学功能鉴定和利用跟不上基因分

离的研究进展

随着人们对蔬菜作物有用目的基因分离重要性认识的不断提高以及在此方面研究的不断加强和深入, 目前已经获得了一些目的基因的全长序列, 但针对这些基因的生理生化方面的基础研究却亟需加强。作者以为, 造成这一现象的原因主要有二: 一是对获得的DNA序列进行生物学功能的进一步研究, 需要更高的技术要求; 二是功能基因组研究需要更大的资金投入, 以购置大型仪器设备和分子生物学试剂。此外, 经过生物学功能鉴定的基因在生产上的应用方面也跟不上基因分离的研究进展。由于目前遗传转化所利用的CaMV35S启动子和GUS等标记基因的产权均在海外, 所以要进行转基因分子育种的产业化必须购买其专利使用权, 这在一定程

度上制约了分离获得基因的利用效率,大大延长了其变为现实生产力的转化周期。所以,在蔬菜作物的基因分离的研究过程中,注重提高基因的生理生化方面的基础研究,加强对获得的基因进行生物学功能验证的研究工作,以及尽可能地减少科研成果转变成现实生产力的周期等方面的问题,将有利于整个研究体系的不断完善,继而提高研究和开发工作的效率。

近年来,从蔬菜作物中分离和克隆重要功能的基因在世界范围内悄然兴起,已经获得了一批重要农艺性状基因,并用于新品种选育和育种材料的获得等方面的研究及开发。但就目前而言,雄性不育与自交不亲和基因的分离由于可以直接应用于种子产业的生产实践,并且对阐明植物小孢子发育的机理有着重要的作用而深受研究者的重视;其次,随着人们生活水平的提高,人们越来越看重蔬菜的品质和无公害化,因此,与品质相关的基因以及植物源的抗病虫害基因将是蔬菜作物目的基因分离的重点之一;再次,与次生代谢产物生物合成相关的基因由于具有广阔的产业化前景而倍受研究者的青睐,如番茄红素、花青素和黄酮类物质生物合成相关的基因等;最后,获得珍稀蔬菜作物的一些特殊性状相关基因将为保存这些珍稀资源的种质提供一条重要的途径。当前,经过多年的积累,我国在植物基因组的测序方面有着较好的研究基础,相信在不远的将来,经过各方的努力,我们将在蔬菜作物的基因组和功能基因组的研究方面为人类的进步作出更多更大的贡献。

参 考 文 献

- [1] 肖岗,张耕耘,刘凤华等. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究[J]. 科学通报, 1995, 40(8): 741 - 745.
- [2] 王淑芳,王峻岭,赵彦修等. 胆碱脱氢酶基因的转化及转基因番茄耐盐性的鉴定[J]. 植物生理学报, 2001, 27(3): 248 - 252.
- [3] XU B, MU J H, NEVINS D L, *et al.* Cloning and sequencing of cDNA encoding two self-incompatibility associated proteins in *Solanum chacoense* [J]. *Mol GEN. Genet*, 1990, 224: 341 - 346.
- [4] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMYTH D R, *et al.* LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1992, 69: 843 - 859.
- [5] 杨素欣,冯献忠,刘平林等. 甘蓝中BcpLH同源基因的克隆及其表达分析[J]. 植物生理学报, 2000, 26(4): 363 - 368.
- [6] 曹必好,宋洪元,雷建军等. 结球甘蓝抗TuMV相关基因的克隆[J]. 遗传学报, 2002, 29(7): 646 - 652.
- [7] LIANG P, ARTHUR B P. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257(14): 967 - 968.
- [8] 曹家树,叶纨芝,曾广文. 白菜核雄性不育两用系花蕾的mRNA差别显示及其cDNA差异片段分析[J]. 浙江大学学报(自然科学版), 2001, 27(6): 596 - 600.
- [9] CHONG K, WANG L P, TAN K H, *et al.* Molecular cloning and characterization of vernalization-related (*ver*) genes in winter wheat [J]. *Plant Physiol*, 1994, 92: 511 - 514.
- [10] 余旭红,彭洁松,冯献忠等. 大白菜包叶特异基因的克隆及其结构特征和表达方式[J]. 中国科学(C辑), 2000, 30(5): 475 - 482.
- [11] ANDERSON M D, CORNISH E L, MAN S L, *et al.* Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca* [J]. *Nature*, 1986, 321: 38 - 44.
- [12] 冯洁,何礼远,袁风华. 马铃薯32KD抗菌蛋白的cDNA分子克隆研究[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(1): 37 - 40.
- [13] TANKSLEY S D. Isozymes in plant genetics and breeding [M], Part A. *Elsevier Sci Publ Co Inc*, 1983
- [14] MARTAIN G B, BROMMONSCHENKE S, CHUNWANGSE, *et al.* Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato [J]. *Science*, 1993, 262: 1432 - 1436.
- [15] 李小方,薛万新,孙玉东等. 芸苔属植物CAL基因的结构特征与花球的形态遗传[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 712 - 718
- [16] NASRALLAH J B, KAO T-H, GOLDBERG M L, *et al.* A cDNA clone encoding an S-locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea* [J]. *Nature*, 1985, 318: 263 - 267.
- [17] STEIN J C, HOWLETT B H, BOYES D C, *et al.* Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 8816 - 8820.
- [18] CASSELMAN A L, VREBALOV J, Conner J A, *et al.* Determining the physical limits of the *Brassica S* locus by recombinations analysis [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 23 - 33.
- [19] SUZUKI G, KAIN, HIROSE T, *et al.* Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S9 haplotype of *Brassica campestris* (syn *rapa*) [J]. *Genetics*, 1999, 153: 391 - 400.
- [20] DAS S, ROSCOE T J, DELSENY M, *et al.* Cloning and molecular characterization of the Fatty Acid Elongase1 (FAE1) gene from high and low erucic acid lines of *Brassica campestris* and *Brassica oleracea* [J]. *Plant Science*, 2002, 162: 245 - 250.
- [21] 李文君,范静华,赵南明等. 萝卜叶绿体ATP酶β亚基cDNA克隆及序列特征[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2001, 41(4): 36 - 40.
- [22] 蒋太交,吉鑫松,黄艳红等. 辣椒过氧化物酶同功酶C基因克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(3): 392 - 397.
- [23] MIN X J, OKADA K, BROCKMANN B, *et al.* Molecular cloning and expression patterns of three putative functional aldehyde oxidase genes and isolation of two aldehyde oxidase pseudogenes in tomato [J]. *Biochimica Biophysica*

- Acta*, 2000, **1493**: 337 - 341.
- [24] 李 鲜, 朱本忠, 罗云波等. 番茄果实中NEVER-RIPE基因的克隆及其反义表达载体的构建 [J]. 农业生物技术学报, 2001, **9**(4): 371 - 373.
- [25] RORAT T, GRYGOROWICZ W J, BERBEZY P, *et al.* Isolation and expression of cold specific genes in potato (*Solanum soganandinum* [J]). *Plant Science*, 1998, **33**: 57 - 67.
- [26] SHIN R, LEE G J, PARK C J, *et al.* Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene [J]. *Plant Science*, 2001, **161**: 727 - 737.
- [27] CHENG C M, PALLOIX A, LEFEBVRE VE'RONIQUE. Isolation, mapping and characterization of allelic polymorphism of *Chi3-P1*, a class III chitinase of *Capsicum annum* L [J]. *Plant Science*, 2002, **163**: 481 - 489.
- [28] MAGIOLI C, BARROCOR M, ANDREA C, *et al.* Somatic embryo formation in *Arabidopsis* and eggplant is associated with expression of a glycine-rich protein gene (*Atgrp- 5*) [J]. *Plant Science*, 2001, **161**: 559 - 567.
- [29] 张玉秀, 张延红, 杨水云等. 菜豆 DnaJ-like 基因组 DNA 片段的克隆及其表达分析 [J]. 西安交通大学学报, 2002, **36**(2): 199 - 203.
- [30] 李园莉, 江元清, 赵武玲等. 向日葵肌动蛋白基因的cDNA克隆及进化分析 [J]. 农业生物技术学报, 2002, **10**(1): 67 - 71.
- [31] 胡松年, 阎隆飞. 豌豆卷须肌动蛋白 II 类异型体 cDNA 克隆的序列分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, **15**(6): 857 - 860.
- [32] 徐华松, 徐云建, 顾雪松等. 豌豆乙酰羟酸还原异构酶基因的 cDNA 克隆及其表达 [J]. 科学通报, 2001, **46**(12): 1022 - 1026.
- [33] 谈建中, 楼程富, 平野久. 大豆特殊种子蛋白豆类胰岛素基因的克隆 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, **26**(1): 107 - 111.
- [34] 严 明, 杨欣秀, 张茹平等. 丝瓜籽核糖体失活蛋白 luffin-b 的基因克隆及表达 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, **33**(2): 205 - 209.
- [35] 李文君, 刘进元, 赵南明等. 苦瓜谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶 cDNA 的克隆及其特征分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28**(6): 908 - 911.
- [36] 王关林, 杨怀义, 夏 然等. 草莓果实膜联蛋白基因(annfaf)全长 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 植物学报, 2001, **43**(8): 874 - 876.
- [37] 庞永珍, 姚剑虹, 申国安等. 葱莲凝集素基因的克隆 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2002, **27**(3): 433 - 436.
- [38] ZHOU Z, METCALF A E, LOVATT C J, *et al.* Alfalfa (*Medicago sativa*) carbamoylphosphate synthetase gene structure records the deep lineage of plants [J]. *Gene*, 2000, **243**: 105 - 114.
- [39] 徐芳秀, 江树业, Harold Cork 等. 籽粒苋(*Amaranthus cruentus* L.)核糖体蛋白S25基因(cDNA)的克隆及其表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2001, **9**(2): 128 - 131.
- [40] 徐芳秀, 江树业, Harold Corke 等. 籽粒苋类 II 型金属硫蛋白基因的分离及其表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2002, **10**(1): 23 - 24.
- [41] 沈义国, 张万科, 阎冬青等. 榆钱菠菜脯氨酸转运蛋白基因的克隆及转基因拟南芥的耐盐性 [J]. 植物学报, 2002, **44**(8): 956 - 962.

Isolation Genes of the Role Agronomical Characters from Vegetable Crops

YU Xiao Lin, HUANG Ke, CAO Jia Shu*

(Institute of Vegetable, Zhejiang University, Huajiachi Campus, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The advances of isolation transgenes methods and genes of the role agronomical characters isolation from vegetable crops were briefly reviewed. The limitation of recent isolation transgenes from vegetables were analyzed and the strategies for the further development of isolation genes of the role agronomical characters from vegetable crops were proposed.

Key words: Vegetable crops; Isolation gene; Agronomical character; Molecular breeding

This work was supported by the Key Sci-technology Project of Zhejiang Province (No. 021102536)

*Corresponding author, E-mail: jshcao@zju.edu.cn