

蒙导授粉条件下转抗除草剂基因油菜与 4 种十字花科杂草间的基因流^{*}

赵祥祥^{1,2,**} 罗玉明¹ 陆卫平² 戚存扣³ 浦惠明³ 王幼平²

1. 淮阴师范学院植物生物技术研究所, 淮安 223001; 2. 扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室,
扬州 225009; 3. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014

摘要 根据苯胺蓝荧光法观察和混合花粉蒙导授粉的结实情况, 并结合授粉后代植株的分子鉴定, 研究了蒙导授粉条件下甘蓝型抗草甘膦油菜 Q3 与遏蓝菜(*Thlaspi arvense* L.)、荠菜 [*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic]、碎米荠(*Cardamine hirsuta* L.)、风花菜 [*Rorippa palustris* (L.) Besser] 4 种十字花科野生杂草间的基因流。结果表明, 当遏蓝菜、荠菜、碎米荠、风花菜分别授以混合花粉(杂草花粉与 Q3 花粉)蒙导后, 与各自的自交组合相比, 混合花粉在受体植物柱头上的萌发表现出花粉粒大量黏合、萌发快、伸进花柱与子房的花粉管数量多等特点。各蒙导组合于授粉后 24—48 h 均可观察到一部分花粉管已经通过珠孔进入胚珠, 但所有蒙导授粉后代植株抗草甘膦基因的 PCR 检测均表现阴性。上述研究结果进一步说明了遏蓝菜、荠菜、碎米荠、风花菜(作母本)与 Q3 杂交高度不亲和, Q3 的抗除草剂基因不能通过基因流转移到这 4 种杂草中。

关键词 转抗除草剂基因油菜 十字花科杂草 蒙导授粉 苯胺蓝荧光法 基因流

近年来, 转基因生物技术得到了迅猛发展, 并被应用于农作物品种改良等许多领域^[1]。但是, 转基因作物在给人类带来巨大的经济效益和社会效益的同时, 也带来了一系列的生物安全问题, 其中比较令人关注的是外源基因通过花粉漂流逃逸到与转基因作物有亲缘关系的植物上, 从而对生态环境造成一定的危害^[2-6]。因此, 对转基因作物与近缘植物间的基因流风险进行研究具有特别重要的科学意义。

油菜是世界四大油料作物之一, 属十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica*)作物。油菜田杂草种类繁多, 其中遏蓝菜(*Thlaspi arvense* L.)、荠菜(*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic)、碎米荠(*Cardamine hirsuta* L.)、风花菜(*Rorippa palustris* (L.) Besser)等是常见的十字花科野生杂草^[7,8]。

这些杂草与油菜一样, 都是异花授粉或常异花授粉植物, 花粉传播方式以风媒和虫媒为主。因此, 外源基因在这些植物间转移的可能性较大, 必须引起足够的重视。国际上关于转基因油菜与近缘植物间基因流的报道较多, 但目前主要集中在油菜与芜菁(*Brassica rapa* L.)^[9-11]、萝卜(*Raphanus raphanistrum* L.)、野芥(*Sinapis arvensis* L.)和白芥(*Sinapis alba* L.)等植物间^[12-15], 而对于转基因油菜与遏蓝菜、荠菜、碎米荠、风花菜等上述杂草间基因流的研究则很少见。

我们前期的研究结果表明, 遏蓝菜、荠菜、碎米荠、风花菜(作母本)与甘蓝型抗草甘膦油菜 Q3(作父本)人工杂交不亲和, 花粉管生长受阻, 分别停滞在杂草的柱头表面或花柱上部 1/3 处, 说明 Q3 的抗除草剂基因难以通过基因流转移到这 4 种

2006 12 21 收稿, 2007 02 12 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 30070152)和淮阴师范学院青年优秀人才支持计划(06QN2C032)资助项目

^{**} E-mail: zhaoxiangxiang2002@yahoo.com.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

杂草中^[16, 17]。但是, 由于杂草与油菜伴生生长, 空气中一定弥漫着杂草和油菜的混合花粉, 因此从理论上讲, 转基因油菜的花粉有可能在杂草花粉的蒙导作用下(一种利用花粉与柱头相互识别机制的混合花粉授粉法, 方法是授不亲和花粉的同时, 混合一些亲和的花粉, 亲和的花粉可使柱头不能识别不亲和的花粉^[18, 19])于杂草柱头表面萌发伸出花粉管, 并进一步伸长进入杂草的子房与胚珠, 从而发生外源基因的转移, 而相关的研究国内外尚无报道。

本实验通过荧光显微镜观察以及混合花粉蒙导授粉的方法, 并结合授粉后代的分子鉴定, 研究了蒙导授粉条件下甘蓝型抗草甘膦油菜 Q3 与上述 4 种十字花科野生杂草间的基因流, 以期对转抗除草剂基因油菜的生态安全性评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

花粉供体材料为江苏省农业科学院从加拿大引进的转抗草甘膦基因油菜品种“Quest”(*Brassica napus* L.) 的高世代品系 Q3, 该品系具有 *GOX* 和 *CP4 EPSPS* 双价抗草甘膦除草剂基因^[20]。花粉受体材料选用遏蓝菜(*Thlaspi arvense* L.)、芥菜[*Capsella bursa pastoris* (L.) Medic]、碎米荠(*Cardamine hirsuta* L.) 和风花菜[*Rorippa palustris* (L.) Besser] 4 种十字花科野生杂草。筛选抗性植株的除草剂为美国 Monsanto 公司生产的 Round upTM, 有效成分为 41% 的草甘膦(Glyphosate)。

1.2 混合花粉在受体植物柱头上萌发的观察

2003 年秋将花粉供体植物与受体植物播种于扬州大学温室内, 其中受体材料种植于 50 cm × 45 cm 盆钵内, 播种前按照浦惠明等的方法用 GA₃ 进行破眠^[21]。受体植物花期人工去雄, 去雄前用酒精棉球擦拭花蕾, 去雄后立即套袋, 次日授以各自的花粉与 Q3 花粉的混合花粉(两者比例约 1 : 1)进行蒙导, 套袋挂牌; 并另外配置自交组合作对照。于授粉后 0.5, 2, 4, 8, 12, 18, 24 和 48 h 分别取各组合的雌蕊 20—25 个, 立即浸泡在 FAA(70%乙醇 90 mL, 冰醋酸 5 mL 和福尔马林 5 mL)固定液中, 4 °C 条件下保存。用苯胺蓝荧光法运用 Leica DMLB 荧光显微镜于 355—425 nm 波长的紫外光下观察混

合花粉在母本柱头上的萌发生长情况^[22]。

1.3 蒙导授粉结实情况观察

遏蓝菜、芥菜、碎米荠和风花菜 4 种受体植物人工去雄后, 授以各自花粉与 Q3 花粉的混合花粉进行蒙导。各组合授粉花蕾数为 100—200 个, 授粉后立即套袋挂牌, 并观察角果的生长和结实情况。

1.4 蒙导授粉后代植株抗草甘膦基因的 PCR 检测

2004 年春将混合花粉蒙导授粉后结实的种子收获, 并于秋季播种。幼苗 3 叶期对所有蒙导后代植株挂牌标记并进行抗草甘膦基因的 PCR 检测。用于 PCR 测试的 *CP4* 和 *GOX* 基因的引物序列由上海申能博彩生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1^[20]。总 DNA 的提取用 SDS 法^[23], PCR 反应体系为: 0.2 mmol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 1U *Taq* 聚合酶, 1× 缓冲液, 引物 0.1 μmol/L, 模板 DNA 40 ng, 反应体积为 20 μL。扩增反应于 MJ PTC 200 梯度 PCR 仪上进行, PCR 循环程序为: 95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 并在 Gene Genius 凝胶图像分析仪上观察照相。幼苗 4—5 叶期按最适喷施浓度每公顷喷施 0.2% 有效浓度的草甘膦 750 kg^[24], 15 d 后观察存活苗数。

表 1 PCR 检测的引物序列

被检测基因	引物序列	预计扩增片段长度(bp)
<i>GOX</i>	P1: 5' CTCTTG TTTTCGTCG TTTCA TC 3'	450
	P2: 5' GAAACCCA TCCACTTGGAG TA 3'	
<i>CP4</i>	P1: 5' CCATCCTCT ACTGCT TTTCCC 3'	398
	P2: 5' GTCTCACCTTCATCGCCATC 3'	

2 结果与分析

2.1 混合花粉在受体柱头上的萌发情况

2.1.1 花粉粒在柱头表面的黏合 荧光显微镜观察结果表明, 风花菜授混合花粉蒙导后 2h, 花粉粒即大量与柱头黏合, 平均达 111.2 个, 有些花粉粒已经开始萌发(图 1(a)); 风花菜自交后 2h, 黏合的花粉粒仅有 26.3 个, 未见有萌发的花粉粒(图

1(b)). 风花菜蒙导授粉后 4—48 h, 柱头上黏合的花粉粒数量达 115.3—133.4 个, 而自交授粉 4—48 h 后, 柱头上黏合的花粉粒数仅为 31.2—47.5 个.

合情况与在风花菜柱头上一样, 黏合在柱头上的花粉粒数量也均比相应的自交组合多, 花粉萌发快(表 2).

混合花粉在遏蓝菜、芥菜、碎米芥柱头上的黏

表 2 不同授粉方式柱头上黏合的花粉粒数目

组合	授粉后时间/h							
	0.5	2	4	8	12	18	24	48
遏蓝菜蒙导授粉	5.2	34.5	39.8	53.3	58.6	65.2	66.3	65.1
遏蓝菜自交授粉	0.3	15.2	23.4	40.3	43.7	48.3	50.2	48.2
芥菜蒙导授粉	15.4	21.8	49.1	57.3	57.8	66.0	69.2	67.5
芥菜自交授粉	0	2.5	5.4	15.2	30.4	35.2	37.8	34.1
碎米芥蒙导授粉	4.5	12.9	24.8	35.2	46.8	65.2	64.9	63.5
碎米芥自交授粉	0	1.9	7.6	16.5	23.9	33.8	35.4	34.2
风花菜蒙导授粉	25.8	111.2	115.3	118.0	125.3	128.2	132.2	133.4
风花菜自交授粉	0.8	26.3	31.2	33.1	36.0	37.2	47.1	47.5

2.1.2 进入花柱与子房的花粉管数目 混合花粉蒙导授粉后进入受体植物花柱与子房的花粉管数目列于表 3 和表 4. 从中可以看出, 当遏蓝菜、芥菜、碎米芥和风花菜 4 种杂草授以混合花粉蒙导后 2—48 h, 伸进花柱与子房的花粉管数目均比自交授粉后相应时间的数目多. 如: 风花菜蒙导授粉后 4 h, 有 13.6 条花粉管伸进花柱, 其中 3.2 条伸入子房

(图 1(c)); 而自交后 4 h 则未见有花粉管伸进花柱和子房(图 1(d)); 碎米芥蒙导授粉后 18 h 进入子房的花粉管数目达 34.5 条, 而自交授粉 18 h 后进入子房的花粉管数目仅 10.1 条(图 1(e)). 此外, 各蒙导组合于授粉后 24—48 h 均可观察到一部分花粉管已经通过珠孔进入胚珠(图 1(f)).

表 3 不同授粉方式伸入花柱的花粉管数

组合	授粉后时间/h							
	0.5	2	4	8	12	18	24	48
遏蓝菜蒙导授粉	0	9.7	20.1	23.2	25.9	32.5	38.5	37.1
遏蓝菜自交授粉	0	1.5	9.1	12.3	18.2	24.1	28.2	30.0
芥菜蒙导授粉	0	14.5	40.8	43.5	47.5	53.0	55.5	51.6
芥菜自交授粉	0	0	0	0.5	23.8	25.9	28.0	24.1
碎米芥蒙导授粉	0	0	7.2	15.2	33.5	45.2	47.9	48.6
碎米芥自交授粉	0	0	0	4.2	11.6	23.4	25.6	26.9
风花菜蒙导授粉	0	0	13.6	26.2	32.8	34.2	36.1	34.8
风花菜自交授粉	0	0	0	17.5	19.4	22.1	26.2	26.1

表 4 不同授粉方式伸入子房的花粉管数

组合	授粉后时间/h							
	0.5	2	4	8	12	18	24	48
遏蓝菜蒙导授粉	0	0	9.5	16.7	18.8	26.5	30.2	29.1
遏蓝菜自交授粉	0	0	0.2	0.8	5.8	14.3	17.2	20.8
芥菜蒙导授粉	0	9.3	22.1	28.0	35.5	38.4	41.2	42.0
芥菜自交授粉	0	0	0	0	13.5	17.0	19.5	17.2
碎米芥蒙导授粉	0	0	0	2.1	14.3	34.5	36.8	35.1
碎米芥自交授粉	0	0	0	0	2.6	10.1	12.5	16.9
风花菜蒙导授粉	0	0	3.2	6.8	9.2	11.2	16.5	24.5
风花菜自交授粉	0	0	0	0	3.1	4.6	11.1	15.8

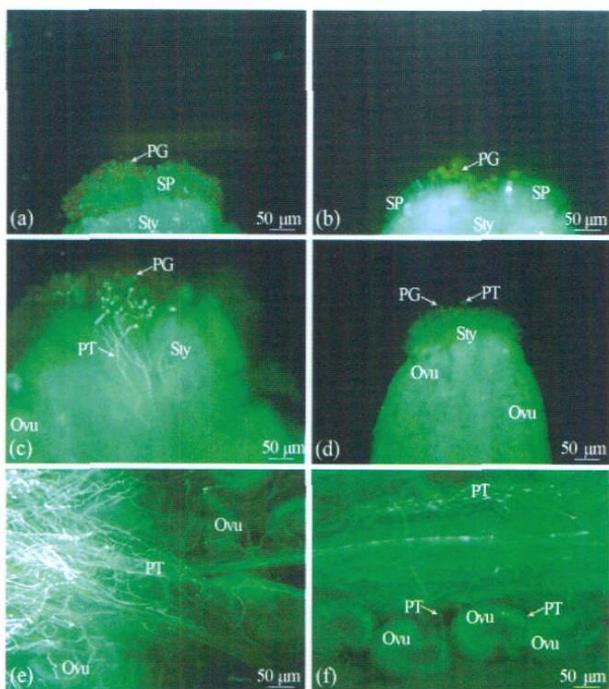


图 1 蒙导授粉后不同时期用脱色苯胺蓝染色的柱头荧光显微照片

(a) 风花菜蒙导授粉 2h 后的柱头部分, 示花粉粒大量与柱头黏合; (b) 风花菜自交 2h 后的柱头部分, 示花粉粒少量黏合; (c) 风花菜蒙导授粉 4h 后的柱头部分, 箭头示一部分花粉管伸进花柱与子房; (d) 风花菜自交授粉 4h 后的花柱部分, 示无花粉管伸进花柱与子房; (e) 碎米芥蒙导授粉后 18h, 示伸进子房的大量花粉管; (f) 风花菜蒙导授粉后 48h 的子房部分, 箭头示一部分花粉管通过珠孔进入胚珠. PG, 花粉粒; SP, 柱头乳突;

Sty, 花柱; PT, 花粉管; Ovu, 胚珠

从上面的实验结果可以看出, 当遏蓝菜、芥菜、碎米芥和风花菜授以混合花粉蒙导后, 与各自的自交组合相比, 混合花粉在受体植物柱头上的萌发表现出花粉粒大量黏合、萌发快、伸进花柱与子房的花粉管数量多等特点. 但由于荧光显微镜观察的局限性, 在此并不能区分那些进入胚珠并最终完成受精的花粉管究竟是杂草还是转基因油菜 Q3 的, 因此还应由下面的研究结果来进一步区分和证明.

2.2 蒙导授粉结实情况

4 种杂草植物授以混合花粉(各自花粉与 Q3 花粉)蒙导后的结实情况列于表 5. 从表 5 可以看出, 遏蓝菜、芥菜、碎米芥和风花菜 4 种杂草授以混合花粉蒙导后, 结角率达 40.51%—63.50%, 每角结籽 3.03—4.04 粒, 与各自的杂交组合相比(结角率

仅为 3.03%—10.50%, 结籽数为 $0^{[16,17]}$), 均有明显提高.

表 5 混合花粉蒙导授粉结实情况

杂草名称	授粉花蕾数	结角数	结角率/%	结籽数	每角粒数
遏蓝菜	200	127	63.50	407	3.20
芥菜	195	79	40.51	283	3.58
碎米芥	115	59	51.30	179	3.03
风花菜	150	73	48.67	295	4.04

2.3 蒙导授粉后代植株抗草甘膦基因的检测

蒙导授粉后代植株抗草甘膦基因的 PCR 检测结果表明(图 2(a), (b)), 所有 293 株遏蓝菜蒙导后代、204 株芥菜蒙导后代、109 株碎米芥蒙导后代以及 185 株风花菜蒙导后代植株均未检测出特异扩增带, 喷施草甘膦后, 无存活苗. 这与我们对蒙导授粉条件下抗除草剂油菜 Q3 与诸葛菜(*Orychophragmus violaceus* L.)、播娘蒿(*Descurainia sophia* L.) 2 种十字花科杂草间的基因流研究结果相同^[25,26]. 可见这些杂草植物的柱头具有选择性, 即使授以混合花粉进行蒙导处理, 仍然优先选择自花花粉参加受精.

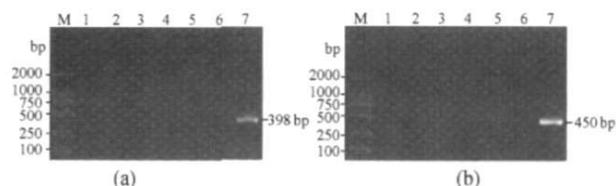


图 2 蒙导授粉后代 CPB 基因(a)和

GOX (b) 基因的 PCR 检测图谱

M, DNA 分子质量标准; 1, 遏蓝菜蒙导后代植株; 2, 播娘蒿蒙导后代植株; 3, 芥菜蒙导后代植株; 4, 碎米芥蒙导后代植株;

5, 诸葛菜蒙导后代植株; 6, 风花菜蒙导后代植株; 7, Q3

上述结果表明遏蓝菜、芥菜、碎米芥、风花菜(作母本)与 Q3(作父本)杂交高度不亲和, 即使授以混合花粉进行蒙导授粉, 也难以打破它们之间的生殖隔离, 进一步说明了 Q3 的抗除草剂基因不能通过基因流转移到这 4 种杂草中.

3 讨论

外源抗除草剂基因能否通过基因流转移到与转基因油菜伴生的杂草中, 从而形成“超级杂草”, 关键取决于转基因油菜与这些杂草间的杂交亲和

性^[25, 26]。但是当油菜与属间植物发生远缘杂交时往往表现出不亲和性, 这种不亲和性决定于花粉壁中蛋白质与柱头乳突细胞表面的蛋白质表膜之间的拒绝反应^[18], 结果导致花粉萌发或花粉管生长在雌蕊一定部位被抑制, 或配子之间不可交配^[19, 27, 28]。在前期的研究中我们运用荧光显微镜观察了转抗草甘膦基因油菜 Q3(*B. napus* L.) 的花粉在遏蓝菜、芥菜、碎米荠和风花菜柱头上的萌发情况, 结果表明上述 4 种杂草与 Q3 杂交不亲和, 花粉管生长受阻, 分别停滞在杂草的柱头表面或花柱上部 1/3 处, 说明 Q3 的抗除草剂基因难以通过基因流转移到这 4 种杂草中^[16, 17]。

不亲和的花粉用亲和的花粉壁蛋白去“蒙骗”, 使柱头接受, 这在一些植物的试验中是成功的。为了克服自交或杂交不亲和性的障碍, 人们不断进行试验, 用混合花粉授粉方法有可能使不亲和性在一定程度上得以克服。方法是授不亲和花粉的同时, 混合一些杀死的亲和的花粉(但以不破坏花粉壁蛋白为原则)。亲和的花粉可使柱头不能识别不亲和的花粉, 被称为蒙导花粉或识别花粉。亲和的花粉所起的蒙导作用的实质, 是由于柱头通过花粉壁中的蛋白来识别花粉的^[18, 19]。

遏蓝菜、芥菜、碎米荠、风花菜 4 种杂草是我国油菜田间常见的十字花科野生杂草, 且都是异花授粉或常异花授粉植物。由于这些杂草与油菜相伴生长, 因此空气中一定弥漫着杂草和油菜的混合花粉。根据蒙导作用的实质, 当杂草与油菜的混合花粉落到杂草柱头上时, 亲和的杂草花粉壁蛋白(虽然杂草花粉没有被杀死)有可能使柱头不能识别不亲和的转基因油菜的花粉, 从而导致抗除草剂基因向这些杂草的转移。因此, 在实验中我们模拟“自然条件”将这 4 种杂草分别授以各自花粉(亲和的)与 Q3 花粉(不亲和的)的混合花粉进行蒙导, 荧光显微镜观察发现各蒙导组合于授粉后 24—48 h 均可观察到一部分花粉管已经通过珠孔进入胚珠, 但所有蒙导后代植株抗除草剂基因 PCR 检测的结果却均表现阴性, 这与蒙导授粉条件下 Q3 与诸葛菜(*O. violaceus* L.)、播娘蒿(*D. sophia* L.) 2 种十字花科杂草间的基因流研究结果相同^[25, 26]。这些结果说明上述杂草与 Q3 杂交高度不亲和, 即使授以混合花粉蒙导, 仍然优先选择自花花粉进行受精, 同

时也进一步说明了 Q3 的抗除草剂基因不能通过基因流向它们发生转移。

本实验中的蒙导花粉未能打破转基因油菜与杂草间的生殖隔离, 这可能与它们之间的亲缘关系较远有关; 但却促进了花粉的萌发、加快了花粉的萌发进程。Villar 等认为在一定条件下, 蒙导花粉不仅可提供识别物质, 还可提供花粉生长促进物质、促进果实发育^[29]。

本研究中我们为了模拟“自然条件”, 所采用的蒙导花粉是杂草与转基因油菜 Q3 的混合花粉, 而并没有将其中的杂草花粉杀死, 因此在荧光显微镜观察混合花粉于母本柱头上的萌发过程中, 我们并不能区分这些花粉究竟属于何种植物, 若要探明蒙导条件下转基因油菜花粉在杂草柱头上的萌发情况, 则必须采用一定的方法(如紫外灯照射、反复冻融等)将杂草花粉杀死(但要注意不能影响花粉壁容纳的蛋白)来制备蒙导花粉, 这还有待进一步研究。

目前, 全球种植转基因油菜的面积已占油菜总面积的 18%, 且均为抗除草剂油菜品种^[1]。我国虽然还没有转基因油菜的商业化种植, 但油菜的转基因研究相当活跃; 同时, 我国是油菜生产大国, 油菜田间的十字花科杂草种类繁多、分布范围广, 且危害严重。本实验仅对转基因油菜与其中几种杂草间的基因流进行了研究, 而对于转基因油菜与其他十字花科野生杂草间的基因流风险(尤其是蒙导授粉条件下)等问题尚需进一步研究。

致谢 感谢北京大学生命科学院胡适宜教授为本论文提供的指导与帮助。

参 考 文 献

- 1 James C. Global status of commercialized biotech/GM crops, 2005. International Service for the Acquisition of Agri Biotech Applications, Ithaca, New York
- 2 魏 伟, 马克平. 如何面对基因流和基因污染. 中国农业科技导报, 2002, 4(4): 10—14
- 3 魏 伟, 马克平, 石纪成. GMOs: 生态学研究中的新热点. 科学通报, 2003, 48(17): 1890—1892
- 4 卢宝荣, 宋志平, 陈家宽. 转基因稻是否会通过基因逃逸导致生态风险. 自然科学进展, 2003, 13(1): 30—35
- 5 Anne Légaré. Risks and consequences of gene flow from herbi

- cide resistant crops: Canola (*Brassica napus* L.) as a case study. *Pest Management Science*, 2005, 61(3): 292—300
- 6 Madsen KH, Streibig JC. Benefits and risks of the use of herbicide resistant crops. FAO Plant Production and Protection Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 2003, 120(Add.1), 245—255
- 7 王枝荣, 辛明远, 马德慧. 中国农田杂草原色图谱. 北京: 农业出版社, 1990, 96—112
- 8 马承忠, 刘滨, 许捷等. 农田杂草识别及防治. 北京: 中国农业出版社, 1999, 136—151
- 9 Pallett DW. Within population variation in hybridisation and transgene transfer between wild *Brassica rapa* and *Brassica napus* in the UK. *Annals of Applied Biology*, 2006, 148(2): 147
- 10 Johannessen MM. Competition affects gene flow from oilseed rape (♀) to *Brassicarapa* (♂). *Heredity*, 2006, 96: 360—367
- 11 Wilkinson MJ, Elliott LJ, Allainguillaume J, et al. Hybridization between *Brassica napus* and *B. rapa* on a national scale in the United Kingdom. *Science*, 2003, 302: 457—459
- 12 Warwick SL, Simard MJ, Legere A, et al. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives; *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O. E. Schulz. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 528—539
- 13 Hikaru S. Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ. Biosafety Res*, 2005, 4(4): 217—222
- 14 Moyes CL, Lilley JM, Casais CA, et al. Barriers to gene flow from oilseed rape (*Brassica napus*) into populations of *Sinapis arvensis*. *Mol Ecol*, 2002, 11: 103—112
- 15 Thalmann C, Guadagnuolo R, Felber F. Search for spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) in agricultural zones and evaluation of the genetic diversity of the wild species. *Bot Helvetica*, 2001, 111: 107—119
- 16 赵祥祥, 夏秋霞, 陆大雷, 等. 转抗除草剂基因油菜与 5 种十字花科杂草的基因流研究. *自然科学进展*, 2006, 16(7): 822—827
- 17 Zhao XX, Xia QX, Lu DL, et al. Gene flow from genetically modified herbicide resistant rapeseed to cruciferous weeds. *Progress In Natural Science*, 2006, 16(9): 936—941
- 18 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社, 1983, 128—130
- 19 约赫里 BM 主编. 维管植物实验胚胎学. 张圣章, 李佳, 周莘译. 上海: 华东师范大学出版社, 1986, 127—139
- 20 张浩夫, 浦惠明, 戚存扣, 等. 转基因抗除草剂油菜的分子鉴定. *江苏农业科学*, 2004, 5: 23—25
- 21 浦惠明, 高建芹. 十字花科杂草种子的破眠研究. *杂草科学*, 2003, 1: 9—11
- 22 胡适宜. 检查花粉在柱头上萌发和花粉管在花柱中生长的制片法. *植物学通报*, 1994, 11: 58—60
- 23 李佳, 沈斌章, 韩继祥, 等. 一种有效提取油菜叶片总 DNA 的方法. *华中农业大学学报*, 1994, 13(5): 521—523
- 24 浦惠明, 高建芹. 草甘磷在抗除草剂油菜田的应用研究初报. *杂草科学*, 2002, 2: 16—17
- 25 Zhao XX, Lu WP, Qi CK, et al. Assessment on alien herbicide resistant gene flow among crucifers by sexual compatibility. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(15): 1604—1611
- 26 赵祥祥, 陆卫平, 戚存扣, 等. 通过杂交亲和性评估外源抗除草剂基因在十字花科植物间的流动. *科学通报*, 2005, 50(16): 1731—1737
- 27 孟金陵, 刘定富, 罗鹏, 等. 植物生殖遗传学. 北京: 科学出版社, 1995, 300—301
- 28 孟金陵. 甘蓝型油菜与近缘种属杂交时花粉雌蕊相互作用的研究. *作物学报*, 1990, 16(1): 19—25
- 29 Villar M, Gaget Faurobert M, Shivanna KR, et al. Mentor effects in pistil mediated pollen pollen interactions. In: *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. New York: Cambridge University Press, 1997, 315—332