



芥菜型油菜黄籽基因分子标记的开发

刘璐,黄镇,卢虹,郎丽娜,赵娜,徐爱遐*

(西北农林科技大学农学院,陕西杨陵 712100)

摘要:该研究在前期对‘吴旗黄芥’黄籽性状遗传图谱研究的基础上,利用白菜及拟南芥基因组信息,在芸薹属白菜A基因组BAC克隆KBrH105I15上设计了5对SCAR引物,在拟南芥第3染色体黄籽基因的同源区域At3g14120与At3g29615附近设计了6对IP引物,11对引物分别扩增F₂群体(‘吴旗黄芥’×‘武功褐芥’)的1212个单株,开发与‘吴旗黄芥’黄籽基因更近的分子标记。结果表明:来自于白菜A基因组BAC克隆KBrH105I15上的Y12(Y12为共显性标记),以及来自于拟南芥第3染色体同源区域At3g24180的IP-6表现与‘吴旗黄芥’黄籽基因紧密连锁,其遗传距离分别为0.2和0.1 cM,较之前最近的标记距离分别缩短0.3和0.2 cM。这2个标记的开发对开展‘吴旗黄芥’黄籽基因的克隆奠定了基础。

关键词:芥菜型油菜;黄籽基因;标记开发

中图分类号:Q789 **文献标志码:**A

Development of Molecular Markers Linked to the Yellow Seed Color Gene in *Brassica juncea* L.

LIU Lu, HUANG Zhen, LU Hong, LANG Li'na, ZHAO Na, XU Aixia*

(College of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Based on the previous genetic map of the yellow seed color gene, the sequences of *Brassica rapa* and *Arabidopsis* genomes were employed to design primers. Five primer pairs were from a *B. rapa* BAC clone KBrH105I15 and six pairs of IP primers were based on a sequence between At3g14120 and At3g29615 in *Arabidopsis* chromosome 3, which is a homologous region of yellow seed color gene. These 11 pairs of primers were used to amplify an F₂ population consisting of 1212 individuals which from ‘Wuqi yellow-seeded’ and ‘Wugong brown-seeded’ mustard. As a result, Y12 from KBrH105I15 and IP-6 from At3g24180 were linked to the yellow seed color gene tightly, and Y12 was a co-dominant marker. These two markers were located on either side of the target gene at a distance of 0.2 and 0.1 cM. The genetic distances were shortened by 0.3 and 0.2 cM, respectively compared to the closest markers reported previously. The development of these two closer markers laid a good foundation for cloning the yellow seed color gene from yellow-seeded mustard.

Key words: *Brassica juncea* L.; yellow seed color gene; markers development

油菜种子成熟时种皮有黄、褐、红褐、黑等颜色,研究表明相同遗传背景下黄籽油菜比褐籽油菜有

皮薄、纤维含量低、含油量高、蛋白质含量高、油清澈透明、品质良好等优点^[1-2],因此受到育种家的广泛

收稿日期:2015-09-09;修改稿收到日期:2015-11-01

基金项目:国家“863”项目(2011AA10A104);教育部博士点基金(20110204120015);杨凌示范区自然基金(2014NY-19);西北农林科技大学唐仲英育种基金

作者简介:刘璐(1989—),女,在读硕士研究生,主要从事油菜生物技术及育种研究。E-mail:381036681@qq.com

*通信作者:徐爱遐,教授,博士生导师,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail:xuaixia2013@163.com

关注。‘吴旗黄芥’是广泛分布于陕北高原的黄籽芥菜型油菜地方品种,由于特殊的地理环境以及气候特点,形成了该地区植物资源遗传的独立性^[3]。‘吴旗黄芥’不仅耐瘠薄、抗旱、抗裂荚,而且具有黄色和褐色两种分类较为清楚的种皮颜色。在先期对吴旗黄芥的研究表明该类型的黄籽性状仅受1对主效基因控制,褐籽相对黄籽表现显性^[4]。Xu等^[5]成功开发黄籽AFLP标记构建了吴旗黄芥黄籽基因的连锁图谱,Huang等^[6]利用该图谱将基因定位到芸薹属基因组A09上,其同源区域位于拟南芥的第3染色体上,并且绘制了由23个标记排序定位褐籽基因的连锁图谱,其中两侧最近的分子标记和黄籽基因的距离分别为0.5和0.3 cM。班元元等^[7]将‘吴旗黄芥’黄籽基因最近的分子标记EA02MC08的序列采用walking技术进行了延长,确定该标记的侧翼序列位于芸薹属A基因组BAC克隆KBrH105I15上。但是基础的定位对于黄籽基因的克隆还是不够的,需要开发更多的分子标记精细定位该基因。

内含子是广泛存在于真核生物基因组中的非编码序列,通常认为它的变异程度高于编码序列,因此可以利用内含子的多态性开发标记^[8],内含子多态性主要包括内含子长度多态性(intron length polymorphism,ILP)和内含子单核苷酸多态性(intron single polymorphism,ISNP)两种类型,在内含子两侧的外显子上设计引物,将内含子扩增出来进行检验其多态性^[9]。IP标记简单易操作,多态性高,结果稳定可靠,最重要的是IP标记是基因内标记,因为IP标记只分布于基因组中存在基因的区域,用IP标记构建的分子遗传图谱可以直接反映基因的连锁关系。IP标记保守性强,在不同的物种间建立起对应关系,使不同物种的分子遗传图谱可以相互比较^[10-13]。谢彦周等^[14]利用拟南芥与油菜共线性设计了122对IP引物,获得了23对与目标基因紧密连锁的IP标记,最终实现了目标基因的精细定位;李霞等^[15]利用拟南芥TT基因开发的IP标记克隆了白菜型油菜种皮色泽基因BrTT8。因此,这些成功的研究都表明IP标记对芥菜型油菜黄籽基因的克隆是有效的。

大量研究表明油菜与拟南芥、白菜基因组之间存在很好的线性关系^[16-17],许多位点在这些物种中都是保守的。拟南芥及白菜A基因组的序列已经公布,所以利用拟南芥及白菜A基因组的序列开发更近的分子标记成为可能。本研究的目的是在前期定位的基础上,借助拟南芥及白菜A基因组已公布

的序列信息开发与‘吴旗黄芥’黄籽基因连锁的IP以及SCAR标记,缩小‘吴旗黄芥’黄籽基因所处的区域。利用Huang等^[6]公布的‘吴旗黄芥’黄籽基因在拟南芥上的同源区域位于At3g14120到At3g29615之间,在此区域附近随机选取位点,根据所选基因的外显子序列设计引物,开发IP标记。利用班元元等^[7]公布的分子标记EA02MC08的侧翼序列位于芸薹属白菜A基因组BAC克隆KBrH105I15上,开发SCAR标记。通过以上途径开发的标记,将会加密黄籽基因的遗传连锁图谱,基因所处的遗传距离缩小至0.1 cM时可初步获得黄籽的候选基因。

1 材料和方法

1.1 试验材料及群体构建

本试验的供试材料为‘吴旗黄芥’(*Brassica juncea* L.)和‘武功褐芥’(*Brassica juncea* L.)杂交构建的F₂群体。由西北农林科技大学油菜研究中心资源品质课题组提供。

‘吴旗黄芥’和‘武功褐芥’均连续自交6代以上,粒色性状稳定。于2012年9月大田中播种由上一年亲本杂交(‘吴旗黄芥’♀×‘武功褐芥’♂)获得的F₁代种子,2013年4月花期对每一个单株进行套袋自交,并且对每一个单株进行编号,作为作图群体,同年6月收获F₂代种子;同年9月播种F₂代种子,将每一个单株收获的种子播种1行(每行约10株),于2014年4月花期自交,同年6月将每一行的种子进行混收,获得F₃代,F₃种子的表现型对F₂代单株基因型进行鉴定,于2014年9月播种F₃代,每一个编号的种子种2行(每行约10株),于2015年6月混同一编号的2行种子(F₄种子),观察种皮颜色是否为单一颜色,以此确定F₃代褐籽群体中纯合基因型和杂合基因型。

本研究所有田间试验在陕西杨陵西北农林科技大学试验田完成。

1.2 F₂群体取样及各代种子种皮考察

2013年9月播种F₂代群体,待油菜植株长至4~5叶期对所有单株进行挂牌取样,于次年4月对所有挂牌的单株进行套袋自交,6月分单株收获,记录每一个单株的种皮颜色,分为黄(包括暗黄、亮黄)和褐(深褐、红褐)两大类型(图1)。

1.3 DNA提取

对4~5叶期F₂单株进行取样,进行全基因组DNA的提取,取1 g左右的新鲜叶片采用CTAB法

提取,参考 Doyle 等^[18]的方法,对 DNA 质量进行检测及浓度测定,最终将样品的 DNA 浓度稀释至 50 ng/ μ L 使用。

1.4 IP 和 SCAR 标记的引物设计

在 NCBI 中搜索拟南芥 At3g14120 到 At3g29615 之间的序列,随机选取 4 个基因的外显子序列,设计 6 对引物,保证所设计的引物序列落在外显子上;将黄籽基因和芸薹属 A 基因组 BAC 克隆 KBrH105I15 进行比对,从白菜 A 基因组 BAC 克隆数据库中下载目标基因,在此基因上不同位置随机设计 5 对引物,共计 11 对引物(表 1)。用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,由上海生工生物工程有限公司合成引物。

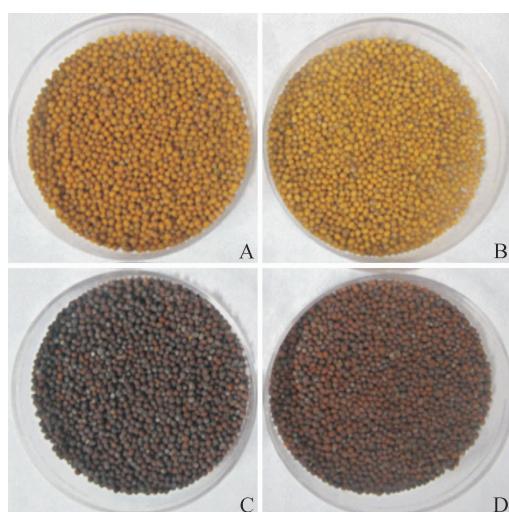


图 1 F_2 代群体种皮颜色分类

A. 暗黄;B. 亮黄;C. 深褐;D. 红褐

Fig. 1 Classification of seed coat color in a subset of the F_2 populations

A. Dark-yellow; B. Bright-yellow; C. Dark-brown; D. Red-brown

1.5 IP 及 SCAR 标记的开发

将上述 6 对 IP 引物和 5 对 SCAR 引物分别扩增一个来源于 F_2 群体的 12 个黄籽(yy)与 12 个纯合褐籽(YY)所组成的小群体,检测这些引物在此小群体中是否具有多态性。经小群体检测具有多态性,产物条带单一且清晰的引物序列用做大群体的筛选,以确定标记和基因的关系。

PCR 反应体系为:DNA 模板:2 μ L(50 mg/L),正向和反向特异引物(上海生工合成)0.4 μ L(10 μ mol/L),dNTP 0.2 μ L(10 mmol/L),MgCl₂ 1.2 μ L(25 μ mol/L),10×PCR buffer 1.5 μ L,DNA 聚合酶(MBI Fermentas)0.15 μ L(5 U),ddH₂O 9.55 μ L,总体积 15 μ L。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 1 min,57.8 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环。对于扩增产物不理想的引物,将退火温度提高 1 到 2 °C,提高扩增产物的特异性。PCR 产物利用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,其具体方法,银染程序参考陆光远等^[19]。

1.6 标记连锁分析

记录在 24 个单株的小群体中能扩增出多态性的引物,用这些引物扩增‘吴旗黄芥’和‘武功褐芥’杂交所获得的 1 212 个群体,有带记为“1”,无带记为“0”。用 Map Marker 3.0 软件对标记在 F_2 群体中扩增所获得的数据进行分析,确定基因与标记间的连锁关系,并利用 Mapdraw 软件绘制遗传连锁图^[20]。

2 结果与分析

2.1 ‘吴旗黄芥’黄籽基因的遗传验证

在本研究中,对来自(‘吴旗黄芥’♀ × ‘武功褐芥’♂)的 1 212 个 F_2 单株,通过 F_3 和 F_4 代种皮色

表 1 引物序列设计

Table 1 Designed primers

标记来源 Marker source	编号 Code	序列 Sequence(5'→3')
at3g20100	IP-1	AAGCCAGAGAGGTTCTAAG/TGAACAGAGAGATTCCAAGC
at3g22030	IP-2	TGTCTGGTGACTCTTA/GTCATACCATATACTTCTC
at3g28100	IP-3	CACTTCCTCCACTAAAGTTCT/CCTATGTAGCTTGTGATCACA
at3g23050	IP-4	CAGCTCCTTACTATGGTA/TCTTGTCTCGTAGCTTGG
at3g27040	IP-5	CCTCTGCAACAATCTTGAGT/GTTCACCTGGGTGATTAAGA
at3g24180	IP-6	GCCCATTGCATTCCCCATAT/GATGGGAAAGTGGATAGAGAC
KBrH105I15	Y11	GCTCACCTATGTCTCACTT/CTCCTTCTCGGGGGCTTCC
KBrH105I15	Y12	CAACCCCATCATACATGGAC/TAGATGCTCTGCCATAGTG
KBrH105I15	Y13	AGAAAAGACAACAAACG/CGATTATGGTGGTTAGTCC
KBrH105I15	Y14	TCCAGCAATGTAACCC/TCTAGTGCTATTAACGTGCC
KBrH105I15	Y15	GACGACTATCTAAACCTCCG/GCAAGACTAGGTAATAACCC

表型鉴定出黄籽 296 株, 纯合褐籽 304 株, 杂合型褐籽 612 株(表 2)。卡方测验表明, 该黄籽性状的遗传符合 $1:2:1$ ($\chi^2=0.22, P\leqslant 0.05$), 属于 1 对主效基因控制。

表 2 ‘吴旗黄芥’各代种子粒色统计结果

Table 2 Statistical result of seed color in various generations of yellow mustard

年份 Year	子代 Generation	种皮颜色 Seed color	数量 Quantity
2012	F ₁	黄色 Yellow	—
2013	F ₂	褐色 Brown	1 212
2014	F ₃	褐色 Brown 黄色 Yellow	916 296
2015	F ₄	褐色 Brown 黄色 + 褐色 Yellow + brown 黄色 Yellow	304 612 296



图 2 引物 IP-6 在 F₂ 小群体(12 黄籽对 12 褐籽)的扩增结果
1~12. 纯合黄籽; 13~24. 纯合褐籽; M 100 bp marker

Fig. 2 Amplification of marker IP-6 in a small group of F₂ population(12 yellow-seed to 12 brown-seed)

1~12. Homozygous yellow-seed; 13~24. Homozygous brown-seed; M. 100 bp marker

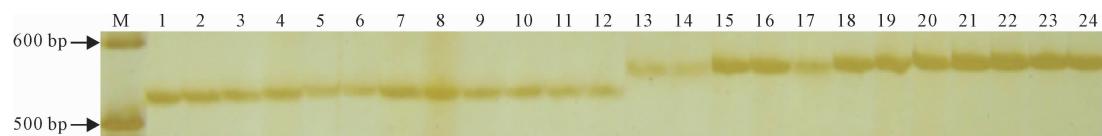


图 3 引物 Y12 在小群体(12 黄籽对 12 褐籽)的扩增结果
1~12. 纯合黄籽; 13~24. 纯合褐籽; M. 100 bp marker

Fig. 3 Amplification of marker Y12 in a small group of F₂ population(12 yellow-seed to 12 brown-seed)

1~12. Homozygous yellow-seed; 13~24. Homozygous brown-seed; M. 100 bp marker



图 4 引物 IP-6 在部分 F₂ 群体的扩增结果
1~29. 黄籽; 30~34. 褐籽; 25. 交换单株; M. 100 bp marker

Fig. 4 Amplification of marker IP-6 in a subset of F₂ population

1~29. Yellow-seed; 30~34. Brown-seed; 25 Recombinant; M. 100 bp marker

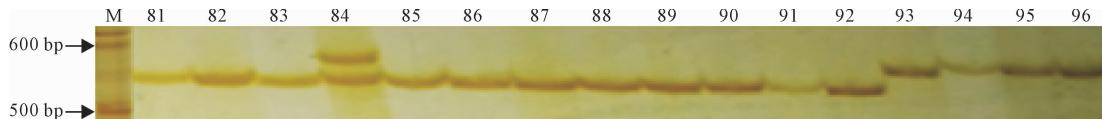


图 5 引物 Y12 在部分 F₂ 群体的扩增结果

84. 杂合褐籽; 93~96. 纯合褐籽; 81~83、85~92. 黄籽; M. 100 bp marker

Fig. 5 Amplification of marker Y12 in a subset of F₂ population

84. Hybrid brown-seed; 93~96. Homozygous brown-seed; 81~83 and 85~92. Yellow-seed; M. 100 bp marker

2.2 黄籽基因连锁的 IP 以及 SCAR 标记

利用 6 对 IP 引物和 5 对 SCAR 引物扩增 24 个单株(12 黄籽对 12 褐籽)的 F₂ 小群体, 结果显示来自于 At3g24180 的 IP-6, 以及来自 BAC 克隆 KBrH105I15 的 Y12 引物能够显示多态性, 其中 IP-6 表现为黄籽有带, 褐籽无带(图 2), 表明其为一个与隐性的黄籽位点连锁的 IP 标记; Y12 能够在黄籽与纯合褐籽中扩增出两条多态性带, 一条与黄籽位点连锁, 一条与褐籽位点连锁(图 3), 表明其为一共显性标记。

2.3 标记连锁分析

利用 IP-6 与 Y12 扫描整个 1 212 个单株的 F₂ 群体, IP-6 在 F₂ 群体中扩增出 5 个交换单株, 其中 296 株黄籽中有 3 个交换单株, 304 株纯合型褐籽中

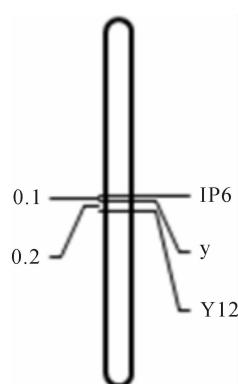


图 6 黄籽基因的遗传连锁图谱

左. 遗传距离(cM);右. 分子标记

Fig. 6 Genetic linkage map of yellow seed gene
Left. Genetic distance (cM); Right. Molecular markers

有 2 个交换单株(图 4), Y12 扩增出 10 个交换单株, 其中 296 株黄籽中有 2 个交换单株, 304 株纯合型褐籽中有 3 个交换单株, 612 株杂合型褐籽中有 5 个交换单株。由于 Y12 为共显性标记, 可将群体中杂合褐籽区分出来(图 5)。结果表明这两个标记与黄籽基因紧密连锁, 分别位于基因的两侧, 其遗传距离分别为 0.1 与 0.2 cM(图 6)。

3 讨论

3.1 拟南芥及白菜基因组对芥菜型油菜黄籽基因定位的作用

拟南芥是双子叶植物的模式植物, 2000 年已经完成全基因组测序。芥菜型油菜 A 基因组和拟南芥及白菜 A 基因组之间存在广泛的共线性^[12-13], 因此利用这些基因组的序列信息发展芥菜型油菜黄籽基因连锁的分子标记具有可行性。在前期的研究中, 控制吴旗黄芥的黄籽基因的同源区域被定位到了拟南芥第 3 染色体上, 并且其中最近的一个分子标记 EA02MC08 位于一个已知序列的白菜 A 基因

组 BAC 克隆上, 因此本研究完全可以利用拟南芥与白菜基因组的序列信息开发更近的分子标记。前人也通过相似的方法开发了一些与目标基因连锁的分子标记。俎峰等^[21]利用拟南芥与白菜基因组的信息开发了 9 个与油菜雄性不育性状连锁的 IP 标记。雷绍林等^[22]利用油菜基因组的部分序列信息开发了 1 个与油菜雄性不育基因连锁的分子标记。本研究在前期定位的基础上开发了 1 个 IP 标记与 1 个 SCAR 标记, 使目标基因连锁的标记的遗传距离进一步缩短, 最近的标记 IP-6 与基因的距离仅为 0.1 cM, 这为黄籽基因的克隆奠定了良好的基础。

3.2 黄籽基因连锁的分子标记的应用

油菜黄籽育种目前受到了很多育种家的重视, 但是由于甘蓝型油菜黄籽资源十分稀缺, 黄籽油菜育种进程比较缓慢, 急需将白菜型油菜与芥菜型油菜中的黄籽基因导入到甘蓝型油菜中, 培育甘蓝型油菜黄籽品系。但是传统的回交转育的方法非常缓慢, 准确性很差, 而油菜黄籽基因连锁的分子标记, 特别是共显性标记的出现, 为黄籽回交转育工作提供了极大的方便。本研究中所开发的 SCAR 标记 Y12 能够区分黄籽(yy)、杂合褐籽(Yy)与纯合褐籽(YY)3 种基因型, 因此在回交转育的分离群体中很容易筛选黄籽植株, 大大提高黄籽选育的进度与准确性。

另外本研究开发的分子标记 IP-6 与 Y12 位于基因两侧, 并且遗传距离很近, 较之传统的 AFLP、RAPD 标记, 其操作简单, 仅需一次 PCR, 成本低, 条带少, 易读带, 因此, 在黄籽性状的筛选中具有较好的应用价值。目前本课题组正在利用这两个分子标记在本实验室的油菜种质资源中筛选具有相同黄籽位点的黄籽品系, 为将来的油菜黄籽材料的遗传改良提供材料。

参考文献:

- [1] 王汉中. 油菜粒色的变异及其不稳定性的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 1990.
- [2] 刘后利. 油菜遗传育种学[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2000.
- [3] XU A X(徐爱遐), MA CH ZH(马朝芝), XIAO E SH(肖恩时), et al. Genetic diversity of *Brassica juncea* from Western China[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2008, 34(5):754—763(in Chinese).
- [4] XU A X(徐爱遐), XIAO E SH(肖恩时), TIAN G W(田广文), et al. Inheritance of seed coat color of yellow mustard(*Brassica juncea* L.) in northern part of Shaanxi[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*(中国油料作物学报), 2007, 29(4):475—478(in Chinese).
- [5] XU A, HUANG Z, MA C, et al. Inheritance of seed color and molecular markers linked to the seed color gene in *Brassica juncea*[J]. Mo-

- lecular Breeding, 2010, **25**(1): 57–65.
- [6] HUANG Z, BAN Y, YANG L, et al. Fine mapping of the yellow seed locus in *Brassica juncea* L. [J]. *Genome*, 2011, **55**(1): 1–7.
- [7] BAN Y Y(班元元), HUANG ZH(黄 镇), XU A X(徐爱遐), et al. Development of intron polymorphism markers linked to the yellow-seeded gene in *Brassica juncea* of Northern Shaanxi[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*(西北农业学报), 2013, **22**(5): 37–41(in Chinese).
- [8] 杨 龙. 利用 cDNA/EST 序列大规模开发内含子多态性标记的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [9] BIERNE N, LEHNERT S A, BÉDIER E, et al. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR[J]. *Molecular Ecology*, 2000, **2**: 233–235.
- [10] ZHANG X W(张兴伟), WANG ZH D(王志德), LIU Y H(刘艳华), et al. IP marker and its application strategy in molecular breeding of tobacco[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*(安徽农业科学), 2008, **36**(8): 3 147–3 149(in Chinese).
- [11] LU Y Q(卢泳全), WANG X SH(汪旭升), HUANG W S(黄伟素), et al. Development of amplified consensus genetic markers in gramineae based on rice intron length polymorphisms[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2006, **39**(3): 433–439(in Chinese).
- [12] LAGERCRANTZ U. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements[J]. *Genetics*, 1998, **150**: 1 217–1 228.
- [13] LAN T, DELMONTE T, REISCHMANN K, et al. An EST-enriched comparative map of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genome Res.*, 2000, **10**: 776–788.
- [14] 谢彦周. 甘蓝型油菜隐形细胞核雄性不育上位抑制基因的精细定位[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [15] 李 霞. 白菜型油菜种皮色泽基因的图位克隆与功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [16] PARKIN I, GULDEN S, SHARPER A, et al. Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genetics*, 2005, **171**: 765–781.
- [17] HOENECKE M, CHYI Y. Comparison of *Brassica napus* and *B. rapa* genome based on the restriction fragment length polymorphism mapping[J]. *The Organizing Committee of the 18th International Rapessed Congress*, 1991: 1 102–1 107.
- [18] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, 1990, **12**: 13–15.
- [19] LU G Y(陆光远), YANG G SH(杨光圣), FU T D(傅廷栋). Silver-stained AFLP-a novel assay for DNA fingerprinting in *Brassica napus* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*(华中农业大学学报), 2001, **20**(5): 413–415(in Chinese).
- [20] LIU R H(刘仁虎), MENG J L(孟金陵). A Microsoft Excel Macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data[J]. *Hereditas*(遗传), 2003, **25**(3): 317–321(in Chinese).
- [21] ZU F(祖 峰), XIA SH Q(夏胜前), DUN X L(顿小玲), et al. Analysis of genetic model for a recessive genic male sterile line 7-7365AB in *Brassica napus* L. based on molecular markers[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2010, **43**(15): 3 067–3 075(in Chinese).
- [22] LEI SH L(雷绍林), YAO X Q(姚雪琴), YI B(易 斌), et al. Towards map-based cloning: fine mapping of a recessive genic male-sterile gene (BnMs2) in *Brassica napus* L. and syntenic region identification based on the *Arabidopsis thaliana* genome sequences[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2007, **115**(5): 643–651.

(编辑: 宋亚珍)