

# 大白菜和结球甘蓝基因组原位杂交及核型分析

郅丽娟, 申书兴\*, 轩淑欣, 王彦华, 陈雪平, 张成合, 李晓峰, 罗双霞  
(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

**摘要:** 为研究 A、C 基因组间的亲缘关系和识别不同染色体, 分别以大白菜 (AA) 和结球甘蓝 (BB) 的基因组总 DNA 为探针, 与大白菜和结球甘蓝的中期染色体杂交。结果表明, 两种基因组总 DNA 在大白菜 20 条染色体和结球甘蓝 18 条染色体上都有杂交信号, 但信号图型有明显差异。大白菜基因组总 DNA 在大白菜和结球甘蓝染色体上的杂交信号几乎都只集中于近着丝粒区和核仁组织区, 但在大白菜染色体上的分布区域略大; 结球甘蓝基因组总 DNA 在其染色体上的杂交信号分散布满其全长, 但在着丝粒区和核仁组织区显示增强的信号带, 而在大白菜中期染色体上则主要集中于着丝粒和近着丝粒区, 且强度弱于大白菜基因组总 DNA 为探针的杂交信号。基于大白菜基因组 DNA 的 GISH 信号对大白菜和结球甘蓝的核型进行了分析。该研究结果为鉴别其种间杂种及其染色体的组成和同源关系提供了分子细胞学依据。

**关键词:** 大白菜; 甘蓝; 基因组原位杂交; 种间杂交; 染色体; 核型分析

**中图分类号:** S 634.1; S 635.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1459-06

## Karyotype Analysis of Chinese Cabbage and Cabbage by Genome *in Situ* Hybridization

QIE Li-juan, SHEN Shu-xing\*, XUAN Shu-xin, WANG Yan-hua, CHEN Xue-ping, ZHANG Cheng-he, LI Xiao-feng, and LUO Shuang-xia

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** In order to study the relationship and identify different chromosomes between the A and C genome of *Brassica*, the labeled genomic DNAs of Chinese cabbage and cabbage were respectively hybridized to their metaphase chromosomes. Nonuniform distribution of the fluorescent labeled probe DNAs were observed on all the chromosomes of two species tested. The signal patterns varied between species and were related to the genome DNA probes. When Chinese cabbage genomic DNA was used as probe, the signals were almost only in the pericentromeric regions and the nucleolus organizer regions (NORs) of Chinese cabbage and cabbage, but the signal regions were larger in former than latter. While cabbage genomic DNA was used as probe, the signals dispersed along the chromosome lengths of cabbage and enhanced signal bands were shown in all pericentromeres and the NORs; Only were observed in the pericentromeres and the NORs of Chinese cabbage chromosomes, and that all the signal intensity was weaker than with genomic DNA probes of Chinese cabbage. Karyotypes of Chinese cabbage and cabbage were analyzed based on GISH signals. The results provided a molecular cytological basis for identification of interspecific hybrids, their chromosomal components and homologous between A and C genomes.

**Key words:** Chinese cabbage; Cabbage; Genome *in situ* hybridization; Interspecific hybrid; Chromosome; Karyotype analysis

收稿日期: 2007-06-25; 修回日期: 2007-09-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471182); 河北省自然科学基金项目 (C2005000222); 河北农业大学将帅计划项目

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: shensx@mail.hebau.edu.cn)

大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*, AA,  $2n = 20$ ) 和结球甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* L., CC,  $2n = 18$ ) 作为芸薹属的基本种, 其起源演化、基因组间的亲缘关系以及细胞遗传学的研究十分重要。Robbelen (1960)、Armstrong 和 Keller (1982) 和 Song 等 (1988) 研究认为, 大白菜和甘蓝是由更加原始的物种进化而来的, 它们在进化过程中发生了大量的染色体变异。比较基因作图分析表明, A、C 物种基因组间具有高度的同源性, 只是在长期的进化过程中, 染色体可能发生融合、分裂、重排, 从而导致染色体数目的变化, 同时也伴随着大片段染色体的易位和倒位 (Lagercrantz & Lydiate, 1996)。目前, 在芸薹属作物上, 染色体鉴定和核型分析是细胞遗传学研究的主题。现今已有几种芸薹属作物的核型发表, 多数是分析有丝分裂期经过不同染色方法处理的染色体 (Fukui et al., 1998; Hasterok & Maluszynska, 2000; Kulak et al., 2002; 申书兴等, 2006; 张成合等, 2006), 也有少数是分析减数分裂期的染色体 (Mackowiak & Heneen, 1999), 核型分析的方法包括常规的 Gimesa 染色、C-带、G-带等和近年来发展的特异序列 (如 45S rDNA、5S rDNA 等) 作探针的荧光原位杂交 (FISH)。基因组原位杂交 (GISH) 作为 FISH 技术的改进技术, 是分析自然多倍体、杂种植物和它们的回交后代的起源、基因组组成及基因内重排的一个有用工具。在芸薹属作物上, 利用基因组原位杂交技术分析 A、B 和 C 基因组间的亲缘关系的研究已有报道 (Snowdon et al., 1997, 2002; 李宗芸等, 2002, 2003), 但迄今还没有被用于染色体的识别和核型分析中。

本研究以大白菜基因组 DNA 和结球甘蓝基因组 DNA 为探针, 分别在大白菜和结球甘蓝的中期染色体上进行基因组原位杂交, 并基于 GISH 信号对大白菜和结球甘蓝进行核型分析, 旨在为研究 A、C 基因组间的亲缘关系和精确鉴别两个基因组及其杂种中不同染色体提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及其染色体制片

供试材料为二倍体大白菜 '85-1M' 和二倍体结球甘蓝 '中甘 11'。染色体制片参照 Song 和 Gustafson (1995) 的方法, 略作修改。当根尖长至 1 cm 左右时, 切取生长旺盛的根尖约 0.2 mm 于 0.002 mol/L 8-羟基喹啉中预处理 2 h, 重蒸水充分洗净后用新鲜卡诺固定液 4℃ 下固定 24 h, 水洗后置于 2% 酶混合液 (纤维素酶: 果胶酶 = 1:1) 中, 25℃ 下酶解约 2.5 h。水洗并固定后采用火焰干燥法制片, -20℃ 保存备用。

### 1.2 基因组 DNA 的提取及标记

采用 CTAB 法提取大白菜和甘蓝的基因组总 DNA, DIG-Nick Translation kit 试剂盒对基因组 DNA 进行标记, 具体标记方法参照 Roche 公司提供的产品使用说明进行。点印迹法检测标记效果。

### 1.3 原位杂交

参照杭超等 (1999) 的方法略做修改。制备好的染色体标本, 在 60℃ 烘箱内烤 1 h, 70℃ 下用 2 倍柠檬酸钠氯化钠缓冲液 ( $2 \times \text{SSC}$ ) 配制的 70% 去离子甲酰胺变性 2.5 min, 立即在 -20℃ 下预冷的 70%、95%、100% 酒精系列浸洗脱水各 5 min。在染色体变性的同时配制杂交液, 75℃ 下变性 5 min, 迅即置于冰上至少 5 min, 备用。酒精系列浸洗脱水后取出的标本在空气中充分干燥, 之后加杂交液和盖片在保湿盒中 37℃ 下杂交 16~21 h。

### 1.4 杂交信号的荧光检测

杂交后用  $2 \times \text{SSC}$  依次在室温、37℃ 各浸洗 10 min, 接着在室温下用  $2 \times \text{SSC}$  和 1 倍磷酸盐缓冲液 ( $1 \times \text{PBS}$ ) 各浸洗 5 min。后依次加羊抗地高辛荧光素抗体、兔抗羊 FITC 偶联物, 37℃ 下每个程序控制反应 1 h, 每次抗体反应后用  $1 \times \text{PBS}$  在室温下各浸洗 3 次, 每次 5 min。

### 1.5 图像检测及分析

杂交检测后染色体制片用 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI 复染。在荧光显微镜 (Zeiss Axioskop40) 下观察, 用

CCD 照相装置俘获图像, 用 Axiovision Imaging System 软件对图像进行合成。

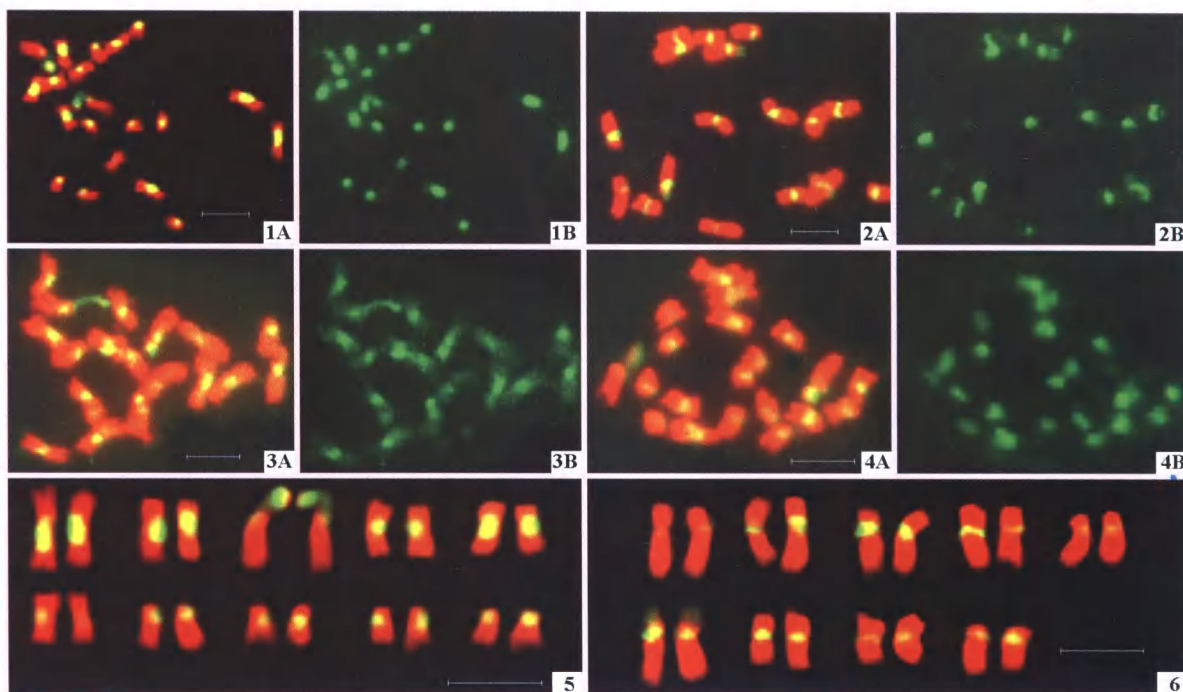
### 1.6 核型分析

按李懋学和张赞平 (1996) 的核型分析方法, 选取染色体分散、形态和着丝点清晰、杂交结果良好的中期染色体分裂相, 用 SPOT™ Advanced 软件进行臂长测量, 结合 GISH 杂交信号用 Photoshop 软件进行同源染色体配对, 并按染色体相对长度由大到小排序, 根据臂比值确定染色体类别。

## 2 结果与分析

### 2.1 大白菜基因组总 DNA 在大白菜和甘蓝中期染色体上的原位杂交结果

以大白菜基因组总 DNA 为探针分别对大白菜和甘蓝的中期染色体进行原位杂交, 杂交结果和信号模式图如图版, 1、2 所示。从杂交信号来看, 大白菜基因组总 DNA 在大白菜中期染色体上集中分布在着丝粒、亚着丝粒区和核仁组织区 (NORs) 上, 信号明显而强烈, 而在染色体的其他部位几乎检测不到; 不同染色体上信号分布区域的大小不同 (图版, 1A 和 1B); 大白菜基因组总 DNA 在甘蓝中期染色体上杂交信号主要集中在着丝粒和亚着丝粒区, 信号很强, 但总的分布区域小于在大白菜染色体上的信号分布, 另外在一对随体染色体断臂的末端 2 个 NORs 区也检测到较弱的荧光信号 (图版, 2A 和 2B)。



图版说明: 1. 大白菜基因组总 DNA 为探针与大白菜中期染色体的基因组原位杂交 (1A 为合成图, 1B 为信号图); 2. 大白菜基因组总 DNA 为探针与甘蓝中期染色体的基因组原位杂交 (2A 为合成图, 2B 为信号图); 3. 甘蓝基因组总 DNA 为探针与甘蓝中期染色体的基因组原位杂交 (3A 为合成图, 3B 为信号图); 4. 甘蓝基因组总 DNA 为探针与大白菜中期染色体的基因组原位杂交 (4A 为合成图, 4B 为信号图); 5. 大白菜基于大白菜基因组总 DNA - GISH 核型图; 6. 甘蓝基于大白菜基因组总 DNA - GISH 核型图。标尺 = 5  $\mu\text{m}$ 。

**Explanation of plates:** 1. GISH of Chinese cabbage with genomic DNA probe of Chinese cabbage on metaphase (1A showed merged image, 1B showed hybridization signals); 2. GISH of cabbage with genomic DNA probe of Chinese cabbage on metaphase (2A showed merged image, 2B showed hybridization signals); 3. GISH of cabbage with genomic DNA probe of cabbage on metaphase (3A showed merged image, 3B showed hybridization signals); 4. GISH of Chinese cabbage with genomic DNA probe of cabbage on metaphase (4A showed merged image, 4B showed hybridization signals); 5. Homologous pairing of Chinese cabbage chromosomes based on Chinese cabbage genomic DNA - GISH; 6. Homologous pairing of cabbage chromosomes based on Chinese cabbage genomic DNA - GISH. Bar = 5  $\mu\text{m}$ .

## 2.2 甘蓝基因组总 DNA 在大白菜和甘蓝中期染色体上的原位杂交结果

以甘蓝基因组总 DNA 为探针分别对大白菜和甘蓝的中期染色体进行原位杂交, 杂交结果和信号模式图如图版, 3、4 所示。

从图版中可以看出, 以甘蓝的基因组总 DNA 为探针, 在其自身染色体上杂交, 杂交信号沿染色体全长分布, 单从信号图就可以清楚地看出 18 条染色体的完整形态; 只是在近着丝粒区和两堆染色体短臂的末端信号强度比其它区域要强, 表现为增强的信号带 (图版, 3A 和 3B)。甘蓝基因组总 DNA 在大白菜 20 条染色体的近着丝粒区和 2 个 NORs 区也均有较强的杂交信号, 而在染色体的其他部位信号十分微弱, 几乎观测不到 (图版, 4A 和 4B)。

## 2.3 基于 GISH 图像的核型分析

依据染色体的大小、臂比、随体的有无及 GISH 信号的特征, 对大白菜和结球甘蓝的核型进行了分析和比较。

由表 1 和图版, 5、6 可见, 大白菜的核型类型为基本对称性核型, 核型公式为  $2n = 2x = 10m + 10sm (2SAT)$ , 其中有 5 对染色体 (1、2、5、6、8 号) 的臂比值在 1.01 与 1.70 之间, 属于中部着丝点类型 (m), 5 对染色体 (3、4、7、9、10 号) 的臂比值在 1.71 与 3.0 之间, 为近中部着丝点类型 (sm), 其中第 3 号为带随体染色体 (SAT), 其臂比值类型和排序与前人研究不同 (Koo et al., 2004; 申书兴 等, 2006)。

结球甘蓝的核型类型为基本不对称性核型, 核型公式为  $2n = 2x = 18 = 8m + 10sm (2SAT)$ , 由 4 个中部着丝点染色体 (2、4、6、7 号) 和 5 个近中部着丝点染色体 (1、3、5、8、9 号) 组成, 其中第 6 号为带随体染色体, 与前人研究结果相同 (李懋学和张赞平, 1996; 张成合 等, 2006)。此外, GISH 信号在大白菜或结球甘蓝各对同源染色体上均表现出明显的特异性 (图版, 5、6), 从而为其核型分析的准确性提供了可靠依据。

表 1 大白菜和结球甘蓝体细胞中期染色体的核型参数

Table 1 Major characters of karyotype of the Chinese cabbage and cabbage metaphase chromosomes

材料 Material	染色体序号 Chromosome number	相对长度 Relative length (%)	臂比值 Arm ratio	类型 Classification
大白菜 Chinese cabbage	1	9.96 + 7.16 = 17.12	1.39	m
	2	7.56 + 4.74 = 12.30	1.59	m
	3	8.46 + 2.94 = 11.40	2.87	sm(SAT)
	4	6.77 + 3.80 = 10.57	1.78	sm
	5	5.39 + 4.80 = 10.19	1.12	m
	6	5.39 + 3.88 = 9.27	1.39	m
	7	5.53 + 2.65 = 8.18	2.09	sm
	8	4.62 + 2.88 = 7.40	1.60	m
	9	4.51 + 2.42 = 6.93	1.86	sm
	10	4.14 + 2.38 = 6.52	1.73	sm
结球甘蓝 Cabbage	1	9.11 + 4.65 = 13.76	1.96	sm
	2	6.59 + 5.96 = 12.55	1.11	m
	3	8.50 + 3.59 = 12.09	2.37	sm
	4	6.59 + 5.10 = 11.69	1.29	m
	5	7.78 + 3.58 = 11.36	2.18	sm
	6	7.47 + 2.66 = 10.13	2.80	sm(SAT)
	7	6.00 + 3.61 = 9.61	1.66	m
	8	5.26 + 4.19 = 9.45	1.26	m
	9	6.70 + 2.66 = 9.36	2.51	sm

### 3 讨论

在芸薹属作物上, Snowdon 等 (1997, 2002) 和李宗芸等 (2002, 2003) 研究结果都表明 A、C 基因组亲缘关系较近, DNA 序列间有着较高的同源性, 利用 GISH 不能区分 A、C 基因组。本试验中, 无论用大白菜基因组 DNA 作探针与甘蓝基因组染色体原位杂交, 还是用甘蓝基因组 DNA 作探针与大白菜基因组染色体原位杂交, 所有染色体上均有较强的信号出现, 说明 A 与 C 基因组间确实存在着高度的同源性, 这和前人的研究结果一致。但是从大白菜、甘蓝基因组总 DNA 为探针分别与二者染色体杂交结果来看, 信号在染色体上的分布及大小还是有区别的, 如大白菜基因组总 DNA 在大白菜染色体上的分布区域较在甘蓝上的分布区域大得多; 甘蓝基因组总 DNA 在大白菜染色体上仅富集于近着丝粒处, 而在甘蓝染色体上除在近着丝粒处富集成带外, 在染色体长短臂上也弥散着杂交信号, 这反映了 A 与 C 基因组间 DNA 序列分布的差异。因此, 根据大白菜或甘蓝任何一个物种的基因组总 DNA 在两个物种染色体上 GISH 杂交图型的差异, 可以将两个物种的染色体区分开来, 这为分析两个物种远缘杂交及回交后代中不同染色体的来源奠定了基础。

从理论上讲, 基因组 DNA 在自身染色体上的原位杂交, 杂交信号应该很强并位于整条染色体上, 这在小麦 (林小虎 等, 2005)、棉花 (郝林 等, 2006) 等作物上的研究已被证实。而在本研究中, 以大白菜基因组总 DNA 为探针在两个物种上杂交时, 杂交信号主要集中于近着丝粒区域, 甘蓝基因组总 DNA 在甘蓝染色体上虽然沿全长分布, 但也是仅在其亚着丝粒区域有很强的信号带, 在其它区域信号很弱, 在前人的研究中对这一现象也有描述 (Snowdon et al., 1997; Benabdmouna et al., 2001), 推测可能是由于重复序列集中分布在染色体亚着丝粒区域, 容易杂交, 而染色体末端区域富含低或单拷贝序列, 不易与探针杂交之故。如此说来, 对 A 与 C 基因组间有明显差异的解释是 C 基因组的染色体臂上可能分布着一部分重复序列, 而 A 基因组的染色体臂上则很少。这也说明 A、C 基因组虽然同源性高, 但在长期的物种分化和进化过程中出现了较大差异, 形成两个物种。

芸薹属作物的染色体很小, 相邻染色体形态又非常相似 (Fukui et al., 1998), 因此不同研究者所得出的染色体的长度和臂比值是不同的。此外, 由于长短臂异染色质含量不同, 染色体在有丝分裂中期浓缩程度的不同使单个染色体的鉴别变的不确定, 也使染色体在核型中的排序变的不一致, 从而导致了在早期芸薹属物种核型研究中存在不同的命名和染色体编号 (Olin-Fatih & Heneen, 1992; Maluszynska & Heslop-Harrison, 1993; Cheng et al., 1995; Hasterok & Maluszynska, 2000; Koo et al., 2004), 同时这也可能是本研究中大白菜染色体的编号与前人研究不同的原因。尽管如此, GISH 信号在大白菜或结球甘蓝各对同源染色体上所表现出的明显的特异性, 为今后不同研究者在这两个物种核型分析中染色体编号的统一奠定了基础, 从而也为芸薹属其他物种的核型分析提供了借鉴。因此, 在芸薹属作物上, GISH 技术将成为核型分析的一种有效的方法。

### References

- Armstrong K C, Keller W A. 1982. Chromosome pairing in haploids of *Brassica oleracea*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 24: 735 - 739.
- Benabdelmouna A, Shi Y, Abirached-Darmency M, Darmency H. 2001. Genomic in situ hybridization (GISH) discriminates between the A and B genome in diploid and tetraploid *Setaria* species. *Genome*, 44: 685 - 690.
- Cheng B F, Heneen W K, Chen B Y. 1995. Mitotic karyotypes of *Brassica campestris* and *Brassica alboglabra* and identification of the *B. alboglabra* chromosome in an addition line. *Genome*, 38: 313 - 319.
- Fukui K, Nakayama S, Ohmido N, Yoshiaki H, Yamabe M. 1998. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 325 - 330.
- Hang Chao, Song Yun-chun, Liu Li-hua, Ding Yi, Tan Guang-xuan. 1999. Comparisons of location between in situ hybridization and cohybridization of two RFLP markers in maize. *Acta Genetica Sinica*, 26 (1): 69 - 75. (in Chinese)

- 杭超, 宋运淳, 刘立华, 丁毅, 谭光轩. 1999. 玉米两个 RFLP 标记的原位单杂交与共杂交定位的比较. 遗传学报, 26 (1): 69-75.
- Hao Lin, Song Gao-li, Li Bing-lin, Wang Kun-bo, Wang Chun-ying, Li Xin. 2006. Karyotype analysis of *Gossypium arboreum* × *G. bickii* by genome *in situ* hybridization. Acta Genetica Sinica, 33 (6): 565-572.
- 郝林, 宋国立, 李炳林, 王坤波, 王春英, 李欣. 2006. 亚比棉基因组原位杂交及核型分析. 遗传学报, 33 (6): 565-572. (in English)
- Hasterok R, Maluszynska J. 2000. Cytogenetic analysis of diploid *Brassica* species. Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot., 42: 145-153.
- Kulak S, Hasterok R, Maluszynska J. 2002. Karyotyping of *Brassica* amphidiploids using 5S and 25S rDNA as chromosome markers. Hereditas, 136: 144-150.
- Koo D H, Plaha P, Lim Y P, Hur Y K, Bang J W. 2004. A high-resolution karyotype of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* revealed by pachytene analysis and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Theor. Appl. Genet., 109: 1346-1352.
- Lagercrantz U, Lydiat D J. 1996. Comparative genome mapping in *Brassica*. Genetics, 144: 1903-1910.
- Li Mao-xue, Zhang Zan-ping. 1996. Crop chromosome and manipulation technique. Beijing: China Agricultural Press: 220-221. (in Chinese)
- 李懋学, 张赞平. 1996. 作物染色体及其研究技术. 北京: 中国农业出版社: 220-221.
- Li Zong-yun, Li Mao-teng, Huang Rong-gui, Wu Xiao-ming, Song Yun-chun. 2002. Genomic *in situ* hybridization (GISH) discriminates the A, B and C genomes in *Brassica* allotetraploid species. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 24 (1): 10-14. (in Chinese)
- 李宗芸, 栗茂腾, 黄荣桂, 伍晓明, 宋运淳. 2002. 基因组原位杂交辨别芸薹属异源四倍体 AA、BB、CC 基因组研究. 中国油料作物学报, 24 (1): 10-14.
- Li Zong-yun, Wu Xiao-ming, Wang Xiu-qin, Song Yun-chun. 2003. Genomic *in situ* hybridization (GISH) analysis of *B. oleracea* and 5 related *Brassica* species. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 25 (4): 16-19. (in Chinese)
- 李宗芸, 伍晓明, 王秀琴, 宋运淳. 2003. 甘蓝与芸薹属 5 个近缘物种的基因组原位杂交分析. 中国油料作物学报, 25 (4): 16-19.
- Lin Xiao-hu, Li Xing-feng, Wang Li-ming, Lu Wen-hui, Wang Hong-gang. 2005. Analysis of factors influencing GISH used in triticeae crops, body cells. Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 38 (2): 126-132. (in Chinese)
- 林小虎, 李兴锋, 王黎明, 陆文辉, 王洪刚. 2005. 麦类作物体细胞基因组原位杂交 (GISH) 效果影响因素的分析. 实验生物学报, 38 (2): 126-132.
- Mackowiak M, Heneen W K. 1999. Meiotic karyotypes of the *B. genomes* of *Brassica nigra* and *B. carinata*. Hereditas, 130: 131-135.
- Maluszynska J, Heslop-Harrison J S. 1993. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. Genome, 36: 774-781.
- Olin-Fatih M, Heneen W K. 1992. C-banded karyotypes of *Brassica campestris*, *Brassica oleracea* and *Brassica napus*. Genome, 35: 583-589.
- Robbelen G. 1960. *Beitrag zur analysis des Brassica genomes*. Chromosoma, 11: 205-228.
- Shen Shu-xing, Hou Xi-lin, Zhang Cheng-he. 2006. A study on obtaining primary trisomics by the isolated microspore culture of autotetraploid Chinese cabbage. Acta Horticulturae Sinica, 33 (6): 1209-1214. (in Chinese)
- 申书兴, 侯喜林, 张成合. 2006. 利用小孢子培养创建大白菜初级三体的研究. 园艺学报, 33 (6): 1209-1214.
- Snowdon R J, Friedrich T, Friedt W. 2002. Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. Theor. Appl. Genet., 104: 533-538.
- Snowdon R J, Kohler W, Friedt W. 1997. Genomic *in situ* hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. Theor. Appl. Genet., 95: 1320-1324.
- Song K M, Osborn T C, Willaims P H. 1988. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) I. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. Theor. Appl. Genet., 75: 651-656.
- Song Y C, Gustafson J P. 1995. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa*). Theor. Appl. Genet., 90: 113-119.
- Zhang Cheng-he, Zhu Hai-yan, Shen Shu-xing, Chen Xue-ping, Wang Hui-ying, Man Hong. 2006. Breeding and cytological identification of a set of primary trisomics in cabbage. Scientia Agricultura Sinica, 39 (7): 1437-1442. (in Chinese)
- 张成合, 祝海燕, 申书兴, 陈雪平, 王会英, 满红. 2006. 结球甘蓝一套初级三体的选育及细胞学鉴定. 中国农业科学, 39 (7): 1437-1442.