

# 大白菜细胞核隐性雄性不育系恢复基因 BrMf2 的标记及定位

张 慧, 张淑江, 武 剑, 李 菲, 章时蕃, 王晓武, 张新梅, 孙日飞

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 【目的】筛选大白菜细胞核隐性雄性不育 (RGMS) 育性基因 (Mf) 的连锁标记, 通过定位该基因, 为克隆雄性不育基因打下基础。【方法】939A 不育系与 YQD56A 杂交 F<sub>1</sub>S<sub>4</sub> 后代为试材, 利用混合分组分析法 (BSA), 应用 SRAP 和 SRAP-AFLP 标记技术筛选引物 1 256 对。【结果】获得与大白菜细胞核隐性雄性不育恢复基因连锁的标记 2 个, PM8K4 和 Me2M49, 与恢复基因的遗传距离分别为 2.98 cM 和 10.92 cM。通过调查 PM8K4 标记在大白菜 DH 作图群体中的多态性, 将该基因定位在 A8 连锁群, 即大白菜第 9 染色体。【结论】标记 PM8K4 可以在苗期对大白菜细胞核雄性不育性状进行标记辅助选择。

**关键词:** 大白菜; 细胞核隐性雄性不育; 基因定位; 分子标记; SRAP

## Mapping of Recessive Genic Male Sterile Restoring Gene (BrMf2) in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*

ZHANG Hui, ZHANG Shu-jiang, WU Jian, LI Fei, ZHANG Shi-fan, WANG Xiao-wu, ZHANG Xin-mei, SUN Ri-fei

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** 【Objective】 Recessive genic male sterility (RGMS) is one of the important methods for F<sub>1</sub> seeds production in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Identification of molecular markers linked to RGMS restoring gene not only can accelerate breeding programs, but also can provide information for cloning of RGMS gene by mapping this gene on the corresponding chromosome. 【Methods】 A segregating population was developed from a cross between a male sterile line 939A and a fertile line YQD56A. SRAP and SRAP-AFLP techniques and bulked segregant analysis (BSA) were used to screen markers linked to the RGMS restoring gene. 【Result】 Among the 1 256 primer combinations, only PM8/K4 and Me2/M49 showed polymorphism between bulks of male sterile and fertile. The polymorphic bands were named as PM8K4 and Me2M49. The distance of PM8K4 and Me2M49 was 2.98 cM and 10.92 cM, respectively. PM8K4 was subsequently mapped on linkage group A8 (Chr9) using a doubled-haploid mapping population. 【Conclusion】 The SRAP and SRAP-AFLP markers developed here can be used in breeding programs for Chinese cabbage.

**Key words:** *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*; recessive genic male sterile (RGMS); gene mapping; molecular marker; SRAP

## 0 引言

【研究意义】大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 是中国最重要的蔬菜作物之一, 存在明显杂种优势, 利用自交不亲和系和雄性不育系制种是目前最常用的杂交制种技术。利用自交不亲和系制种存在成本高, 亲本繁殖困难, 植株活力下降和杂交率不

稳等问题。【前人研究进展】20 世纪很多国家相继开始对细胞质和细胞核遗传大白菜雄性不育进行了广泛研究。1990 年, 张书芳等<sup>[1]</sup>从‘万泉青帮’大白菜品种中发现了显性不育基因及其显性上位可育基因, 得到了 100% 雄性不育群体, 首次在大白菜中提出了“细胞核基因互作雄性不育系应用模式”。随后冯辉等<sup>[2]</sup>也相继育成了具有 100% 不育株率的大白菜核基因雄

收稿日期: 2009-07-10; 接受日期: 2009-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571273)、国家“863”计划项目 (2006AA100108, 2008AA10Z154)、农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目、国家“十一五”科技支撑计划项目 (2008BADB1B01-1)

作者简介: 张 慧, 博士研究生。E-mail: chercheurzhang@yahoo.com.cn. 通信作者孙日飞, 研究员, 博士。E-mail: rifei.sun@caas.net.cn

性不育系,提出了大白菜细胞核不育的“复等位基因遗传假说”。这两种遗传模式应用广泛,他们的共同点是建立隐性雄性不育系和显性雄性不育系,通过两系组配形成 100%雄性不育系,不同之处在于控制不育性的基因是否在同一位点上。根据不同遗传模式相应出现了很多转育方法<sup>[3-5]</sup>,但存在转育时间长、步骤繁琐等问题。近年来随着研究的深入,利用分子生物学手段对大白菜细胞核雄性不育基因进行标记研究,可以加快雄性不育系的转育速度,更好地将不育系用于杂种生产。张淑江等<sup>[6]</sup>在显性细胞核雄性不育系中找到了 1 个与不育基因连锁的 RAPD 标记并转化为 SCAR 标记。Ying 等<sup>[7]</sup>对小白菜细胞核隐性雄性不育系恢复基因进行了 AFLP 标记,沈向群等<sup>[8]</sup>对大白菜细胞核隐性雄性不育系的研究中找到了跟育性恢复基因相连锁的 RAPD 标记,但仍未确定其连锁群及在染色体中的位置。Feng 等<sup>[9]</sup>于 2009 年找到了与复等位雄性不育基因相连锁的 SSR 标记,并定位在 A7 连锁群中。【本研究切入点】本文通过分子标记的手段,对大白菜细胞核隐性雄性不育系进行系统研究。【拟解决的关键问题】以期找到与恢复基因及不育基因连锁的标记,并对该基因进行染色体定位,为加快大白菜细胞核雄性不育基因的转育以及雄性不育遗传模式的确定奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料 939A 为雄性不育两用系,其不育株花药干瘪,无花粉,可育株正常;YQD56A 为大白菜自交系。以 939A 不育系为母本与 YQD56A 进行杂交,之后系内姐妹交 3 代,种植 14 株  $F_1S_3$ ,其中不育的 11 株、可育的 3 株用于建池筛选引物。利用  $F_1S_3$  可育株进行自交构成  $F_1S_4$ ,育性出现 3:1 分离,此群体用于连锁分析。试验材料构建如图 1。大白菜细胞核雄性不育恢复基因用 BrMf 表示,其中 Br 代表大白菜 (*Brassica rapa*),Mf 代表恢复基因(male fertile gene)。

恢复基因的定位利用已构建了遗传连锁图的大白菜 DH 群体<sup>[10]</sup>。作图亲本为 Y117-12 和 Y195-93,包含 181 个 DH 株系,图谱由 203 个 AFLP 标记,58 个 SSR 标记,22 个 SRAP 标记以及 4 个 STS 标记构成。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及建池 采集大白菜单株叶片,冻干磨成粉末。采用改良后的 CTAB 法<sup>[11]</sup>对冻干样品提取基因组 DNA。并用 1.0%琼脂糖凝胶电泳以

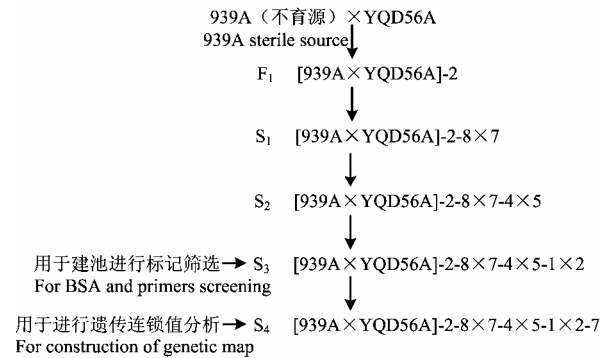


图 1 大白菜雄性不育分离群体的构建

Fig. 1 Schematic view of construction of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* segregating population

及 DNA 检测仪对所提 DNA 浓度纯度进行检测。

利用混合分组分析法 (BSA)<sup>[12]</sup>,可育株 3 株构建可育池 F,不育株 11 株构建不育池 S,用于标记多态性筛选。

1.2.2 SRAP 反应体系建立和引物筛选 SRAP 反应体系参照 Li 等<sup>[13]</sup>的方法,并稍作改动。SRAP-AFLP 标记反应体系是根据 SRAP 反应原理,利用 SRAP 引物与 AFLP 引物组合,通过 SRAP 反应体系对基因组进行扩增,产生多态性条带。PCR 扩增体系均采用 20  $\mu$ L,基因组 DNA 100—150 ng,1  $\times$  Buffer,0.8 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs,0.375 pmol· $\mu$ L<sup>-1</sup> 引物,0.5 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,35 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物加入 8  $\mu$ L 非变性双色缓冲液,利用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物,电泳恒压 160 V,0.5  $\times$  TBE 为缓冲液。利用快速银染法<sup>[14]</sup>对凝胶进行染色,照相保存。统计多态性条带,并把存在多态性条带的引物再次在育性池中扩增,验证多态性。

SRAP 引物由相关文献获取<sup>[15-18]</sup>,共合成 SRAP 正向引物 25 条,反向引物 32 条。AFLP 引物参照 Vos 等的方法<sup>[19]</sup>,包括 *Eco*R I-NNN 6 条,*Mse* I-NNN 7 条。由上海生工生物工程技术有限公司合成引物。

1.2.3 SSR 反应体系建立和引物筛选 SSR 反应扩增体系为 20  $\mu$ L,基因组 DNA 100 ng,1  $\times$  Buffer,0.8 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs,0.2 pmol· $\mu$ L<sup>-1</sup> 引物,0.5 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物加入 6  $\mu$ L 溴酚蓝变性缓冲液。利用快

速银染法对凝胶染色, 照相保存。统计多态性条带。

SSR 引物由相关文献获取<sup>[9,20-22]</sup>, 共合成 SSR 引物 201 对。由上海生工生物工程技术有限公司合成引物。

**1.2.4 特异条带的回收、克隆及测序** 从聚丙烯酰胺凝胶上挖取特异条带, 加入 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 浸泡过夜, 95 $^{\circ}\text{C}$  30 min, 10 000 r/min 离心 10 min。取 5  $\mu\text{L}$  上清液为模板, 用相对应的引物再次扩增, PCR 产物用 75% 乙醇沉淀纯化, 溶解到 10  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 中, 取 1  $\mu\text{L}$  连接到 pMD18-T 载体, 挑取单菌落, PCR 验证, 对含有目标片段的单克隆进行测序。

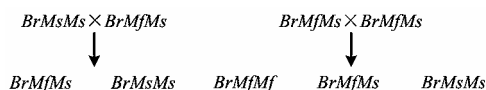
**1.2.5 多态性标记在作图群体中的验证及定位** 利用 BSA 法筛选到的与雄性不育恢复基因连锁的标记, 首先在 DH 作图群体两亲本中进行验证。如标记在 DH 群体亲本间具有多态性并与 BSA 中扩增片段长度一致, 则把多态性片段回收测序(方法与上步相同), 与 BSA 中获得的序列进行比对。检测标记在作图群体中的多态性, 并利用 JoinMap3.0 软件把此标记做到遗传连锁图上。

## 2 结果

### 2.1 大白菜细胞核隐性雄性不育系的遗传学分析

939A 大白菜核雄性不育系表现为系内姐妹交后代育性 1:1 分离, 可育株自交出现 3:1 分离(图 2)。YQD56A 是一大白菜高代自交系。939A 不育系与 YQD56A 杂交, F<sub>1</sub> 代出现育性分离, 系内再姐妹交三代 F<sub>1</sub>S<sub>3</sub>, 育性仍分离, 可育株再自交一代, 后代 164 个单株中 39 株为不育株, 125 株为可育株, 育性表现为 3:1 分离( $\chi^2=0.066 < \chi^2_{0.05}=3.841$ )。说明该雄性不育为单基因控制的细胞核隐性雄性不育。育性恢复基因和不育基因在同一位点上, 定位恢复基因即定位了不育基因。

### 2.2 引物筛选及遗传连锁值的确定

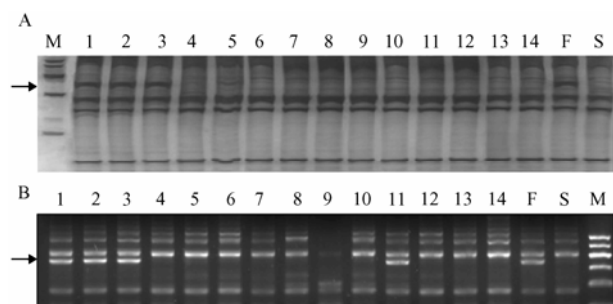


*BrMf* 为可育基因; *BrMs* 为不育基因  
*BrMf* is fertile gene; *BrMs* is sterile gene

图 2 大白菜细胞核隐性雄性不育系遗传模式

Fig. 2 The genetic model of recessive genic male sterile (RGMS) gene

利用 F<sub>1</sub>S<sub>3</sub> 代单株建池, 将可育的 3 株 DNA 等量混合, 不育的 11 株 DNA 等量混合, 构建可育池 F 和不育池 S。利用这两个池筛选引物, 共筛选 SRAP 引物组合以及 SRAP-AFLP 引物组合 1 256 对, 平均每对引物产生条带 9.1 条。经过建池单株验证, 筛选到与雄性不育基因连锁的标记 2 个(图 3), 分别命名为 Me2M49 和 PM8K4(表)。对进一步利用大群体中的 32 单株再次对筛选出的标记进行检验, 通过 3 次检验确认存在多态性的引物组合。筛选 SSR 引物 201 对, 未发现多态性标记。



A: PM8K4 标记在育性池以及单株中的多态性分布。B: Me2M49 在育性池以及单株中的多态性分布。1—3 为可育株; 4—14 为不育株; 11 为重组单株; F 为可育池; S 为不育池。M 为 marker 1

A: Polymorphic pattern of PM8K4. B: Polymorphic pattern of Me2M49. 1-3 are fertile individuals; 4-14 are sterile individuals; and the 11th individual is a recombinant one. M is marker 1

图 3 PM8K4 和 Me2M49 标记在育性池以及建池单株中的多态性

Fig. 3 Polymorphic patterns of PM8K4 and Me2M49 between fertile and sterile bulks and among individuals

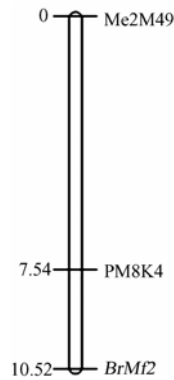
表 细胞核隐性雄性不育基因连锁标记信息

Table The markers linked to the recessive genic male sterile (RGMS) gene

标记名称 Marker name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	多态性片段大小 The size of the polymorphic fragments (bp)
PM8K4	PM8: CTGGTGAATGCCGCTCT	351
	K4: GACTGCGTACCAATTCGCC	
Me2M49	Me2: TGAGTCCAAACCGGAGC	340
	M49: GATGAGTCCTGAGTAACAG	

在 164 个单株的 F<sub>1</sub>S<sub>4</sub> 群体中验证 PM8K4 和 Me2M49 的多态性。统计数据后, 用 JoinMap3.0 软件绘制遗传连锁图。标记 PM8K4 和 Me2M49 均在不育

基因一侧，与不育基因的距离分别为 2.98 cM 和 10.52 cM。（图 4）

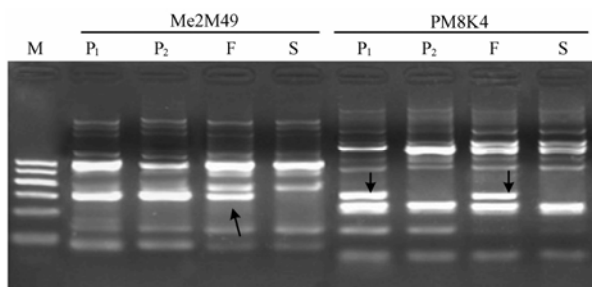


图左侧为各标记的遗传距离，右侧为标记名称，*BrMf2* 代表大白菜细胞核隐性雄性不育系恢复基因  
Marker loci are listed to the right side and recombination distances (cM) to the left side of the bar. *BrMf2* is recessive genic male sterile (DGMS) restore gene in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*

图 4 PM8K4 和 Me2M49 标记与育性恢复基因间的连锁关系  
Fig. 4 The linkage map of PM8K4, Me2M49 and *BrMf2* gene

### 2.3 大白菜细胞核隐性雄性不育系恢复基因的定位

为了定位该雄性不育系的恢复基因，对两个多态性标记在大白菜作图群体亲本中检测多态性。Me2/M49 没有检测出与 BSA 中扩增片段长度一致的多态性片段。PM8/K4 引物组合在两亲本中扩增出与 BSA 中扩增片段长度一致的多态性片段（图 5）。之后，检测作图群体中 PM8K4 标记的多态性，通过



P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>: DH 作图亲本; F: 可育池, S: 不育池; M: Marker1  
P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>: The parental lines of DH population; F: Fertile bulk, S: Sterile bulk, M: Marker 1

图 5 多态性标记在作图亲本及育性池中的多态性比较  
Fig. 5 Comparison of PM8K4 and Me2M49 polymorphic patterns between the parental lines of DH population and fertile and sterile bulks

JoinMap3.0 软件分析，将此标记定位在 A8 连锁群上，即第 9 染色体，因此确定大白菜细胞核隐性雄性不育恢复基因在第 9 染色体上（图 6）。

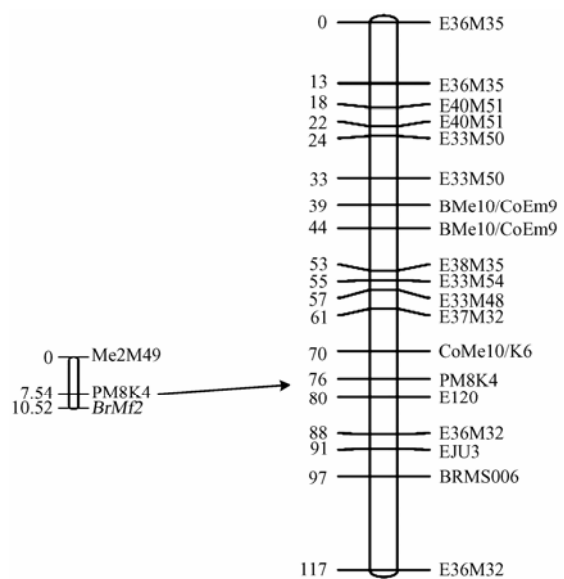


图 6 PM8K4 在育性群体以及 DH 群体遗传连锁图中的位置对比  
Fig. 6 Comparison of the position of PM8K4 between fertile population and DH mapping population

对 PM8K4 在育性群体以及作图群体中的多态性条带进行回收，克隆测序。所得序列均为 351 bp。将两序列进行 BLAST 比对，在育性池中扩增出的多态性片段序列与在作图亲本中扩增出的多态性片段序列长度一致，序列信息相同（图 7）。结果显示在两不同群体中的多态性片段为同一个标记，可以通过它在不同群体中的多态性进行定位。

### 3 讨论

SRAP 标记是 Li 等于 2001 年开发的针对基因外显子里 GC 含量丰富而启动子、内含子里 AT 含量丰富的特点来设计引物扩增内含子以及基因间变异丰富的区域。SRAP 标记以其简单、稳定、共显性、中等产率、在基因组中分布均匀的优点，已成功应用于多个物种中。本文对 SRAP 标记进行了扩展，利用 AFLP 引物与 SRAP 引物进行组合，得到 SRAP-AFLP 标记，并对二者的多态性进行了比较。本研究中，SRAP 引物共筛选 800 对引物组合，筛选得到 1 个标记，多态性比率为 0.125%，SRAP-AFLP 共筛选了 456 对引物



图 7 多态性片段序列比对结果

Fig. 7 Sequence alignment between fertile population and DH mapping population

组合, 筛选得到一个标记, 多态性比率为 0.219%。通过比较, SRAP 引物与 AFLP 引物进行组合, 利用 SRAP 体系进行多态性扩增, 同样可以产生丰富条带, 多态性比率较 SRAP 引物组合高。这不仅扩展了 SRAP 标记的使用范围, 更提供了一种更高多态性效率的标记方法。

本研究对 PM8K4 标记进行了测序, 对序列进行分析后在序列内部设计引物, 进行 PCR, 经分析该片段多态性位点产生于引物区域而不在序列内部。下一步可借助 PCR walking 等方法延长已知序列信息, 将该标记转换成 SCAR 标记。而本试验找到的 PM8K4 标记产生条带较少, 在琼脂糖和丙烯酰胺凝胶中均可以较好的显示, 多态性标记清晰可见。SRAP-AFLP 标记的试验操作十分简便, 无需酶切, 扩增稳定性。因此可以替代 SCAR 标记用于标记辅助选择。

随着现代分子生物学的发展, 利用分子标记技术对目标基因进行标记, 并通过同一个标记或基因组锚定标记在不同群体的多态性对其定位的方法已得到广泛应用。近年来, 芸薹属作物已有多个基于不同标记的遗传图谱<sup>[20-24]</sup>, 这丰富了定位基因的标记类型。通过参考图谱的整合<sup>[22]</sup>, 比较基因组学的发展<sup>[25-27]</sup>, 把不同图谱以及不同作物相互关联起来, 利用一个锚定标记可以在不同图谱中找到更多的与目的基因连锁的标记, 也可利用标记在不同作物中的分布研究基因的演变。随着白菜全基因组测序工作的开展 (BrGP)<sup>[28]</sup>, 更多的基于基因组序列信息的标记被

开发出来, 这些标记更方便了对目标基因的染色体进行定位。

本研究将大白菜隐性雄性不育基因定位于 A8 连锁群, 即第 9 染色体。在芸薹属中, U 三角阐明了各种作物间的关系, 其中, 白菜基因组为 AA, 甘蓝属于 CC, 甘蓝型油菜为异源四倍体 AACC。与本研究所得结果相比, 甘蓝型油菜现已发现多个控制雄性不育的寡基因, 部分基因已定位到染色体上。其中隐性雄性不育基因 Bnms2<sup>[29]</sup>定位于 N16 连锁群上, 隐性雄性不育基因 Bnms3<sup>[30]</sup>定位于 N19 连锁群上, 他们分别对应 C 基因组的第 6 和第 9 染色体。隐性雄性不育基因 Bnms1<sup>[31]</sup>定位于 N7 连锁群, 来源于 A 基因组的第 7 染色体, 即与大白菜第 7 染色体相关联。迄今没有不育基因定位于甘蓝型油菜 N9 连锁群报道。在大白菜中, Feng 等<sup>[9]</sup>于 2009 年利用 SSR 和 AFLP 标记将一个复等位雄性不育基因定位在 A7 连锁群 (第 7 染色体上)。本研究对复等位基因连锁的 SSR 标记以及 187 对 SSR 标记<sup>[24-26]</sup>进行了筛选, 没有发现多态性标记。该结果表明, 该恢复基因及其等位的不育基因与复等位雄性不育基因及其等位的恢复基因不在同一染色体的同一座位上, 两基因应属于不同来源的不同雄性不育突变体, 两不育基因之间的关系有待于进一步研究。而同样定位在第 7 染色体的甘蓝型油菜 Bnms1 基因和大白菜复等位基因由于缺乏共显性的标记因此无法判断它们是否在染色体的同一区段。以上结果为白菜以及甘蓝型油菜细胞核雄性不育的利用及发掘打下了坚实的基础。

## 4 结 论

本研究利用 SRAP、SRAP-AFLP 分子标记技术, 筛选出两个与大白菜细胞核隐性雄性不育系恢复基因紧密连锁的标记 Me2M49 和 PM8K4。通过 PM8K4 标记在作图群体中的多态性, 将育性恢复基因定位在 A8 连锁群, 第 9 染色体上。该标记可以用于大白菜细胞核雄性不育性状的标记辅助选择。

### References

- [1] 张书芳, 宋兆华, 赵雪云. 大白菜细胞核基因互作雄性不育系选育及应用模式. 园艺学报, 1990, 17(2): 117-125.
- Zhang S F, Song Z H, Zhao X Y. Breeding of interactive generic male sterile line in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis rapa*) and utilization model. *Acta Horticulturae Sinica*, 1990, 17(2): 117-125. (in Chinese)
- [2] 冯 辉, 魏毓棠, 许 明. 大白菜核基因雄性不育系遗传假说及其验证. 中国科协第二届青年学术年会, 园艺学论文集. 北京: 北京农业大学出版社, 1995: 458-466.
- Feng H, Wei Y T, Xu M. Genetic model for genic male sterile line of Chinese cabbage and its verification. *The Proceeding of Horticulture of the Secondly Youth Science Annual Meeting of China Association for Science and Technology, Horticulture Dissertation*. Beijing: Beijing Agriculture University Press, 1995: 458-466. (in Chinese)
- [3] 吕艳玲, 陶承光, 王 鑫. 利用杂交种转育大白菜核基因雄性不育系的研究. 华北农学报, 2008, 23(3): 31-33.
- Lü Y L, Tao C G, Wang X. Study on transfer of the male sterile line in Chinese cabbage by using hybrid seed. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2008, 23(3): 31-33. (in Chinese)
- [4] 许 明, 冯 辉, 魏毓棠, 王世刚. 大白菜核复等位基因向可育品系 92-11 的转育. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(4): 324-327.
- Xu M, Feng H, Wei Y T, Wang S G. Transfer from multiple allele of genic male sterile to male fertile line 92-11 in Chinese cabbage. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2000, 31(4): 324-327. (in Chinese)
- [5] 闻凤英, 张 斌, 刘晓军, 王玉龙, 宋连玖, 赵 冰. 青麻叶大白菜核基因雄性不育性遗传模式的研究. 华北农学报, 2003, 18(4): 42-45.
- Wen F Y, Zhang B, Liu Xiao J, Wang Y L, Song L J, Zhao B. The research on genetic model of nuclear male sterile character in qingmaye type of Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2003, 18(4): 42-45. (in Chinese)
- [6] 张淑江, 李 菲, 韩和平, 章时藩, 钮心恪, 孙日飞. 大白菜细胞核显性雄性不育基因连锁标记的筛选. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2379-2385.
- Zhang S J, Li F, Han H P, Zhang S F, Niu X K, Sun R F. Molecular marker linked to a dominant male sterile gene in Chinese cabbage [*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis* (Lour.) Olsson]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(8): 2379-2385. (in Chinese)
- [7] Ying M, Dreyer F, Cai D G, Jung C. Molecular makers for genic male sterility in Chinese cabbage. *Euphytica*, 2006, 149: 211-219.
- [8] 沈向群, 杨文俊. 大白菜核基因显性雄性不育育性恢复基因的 RAPD 标记. 园艺学报, 2004, 31(6): 731.
- Shen X Q, Yang W J. RAPD marker linked to the fertile restoring gene for dominant genic male sterile line in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(6): 731. (in Chinese)
- [9] Feng H, Wei P, Piao Z Y, Liu Z Y, Li C Y, Wang Y G, Ji R Q, Ji S J, Zou T, Choi S R, Lim Y P. SSR and SCAR mapping of a multiple-allele male-sterile gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119: 333-339.
- [10] Wu J, Yuan Y X, Zhang X W, Zhao J J, Song X F, Li Y, Li X N, Sun R F, Maarten K, Mark G. M. Aarts, Wang X W. Mapping QTLs for mineral accumulation and shoot dry biomass under different Zn nutritional conditions in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Soil*, 2008, 310: 25-40.
- [11] Wang X W, Lou P, Guusje B, Yang B J, He H J, Zhang Y G, Fang Z Y. Linkage mapping of a dominant male sterility gene Ms-cd1 in *Brassica oleracea*. *Genome*, 2005, 48: 848-854.
- [12] Michelmore R W, Paranand J, Kessal R V. Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88: 9829-9832.
- [13] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and Gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 455-461.
- [14] Sanguinetti C J, Neto E D, Simpsor A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels-polymerase chain reaction product recovery. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 914-921.
- [15] Wang G, Pan J S, Li X Z, He H L, Wu A Z, Cai R. Construction of a cucumber genetic linkage map with SRAP markers and location of the genes for lateral branch traits. *Science in China Ser. C: Life Science*, 2005, 48(3): 213-220.
- [16] Budak H, Sheraman R C, Parmaksiz I, Gaussoin R E, Riordan T P,

- Dweikat I. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 328-334.
- [17] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, He D H, Wu M Q. Construction of a genetic linkage map for cotton base on SRAP. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(19): 2063-2067.
- [18] Riaz A, Li G, Quresh Z, Swati M S, Quiros C F. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breeding*, 2001, 120: 411-415.
- [19] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [20] Lowe A J, Moule C, Trick M, Edwards K J. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in Brassica crop species. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 1103-1112.
- [21] Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Kondo M, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Hirai M, Matsumoto S. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance. *Genetics*, 2006, 173: 309-319.
- [22] Choi S R, Teakle G R, Plaha P, Kim J H, Allender C J, Beynon E, Piao Z Y, Soengas P, Han T H, King G J, Barker G C, Hand P, Lydiate D J, Batley J, Edwards D, Koo D H, Bang J W, Park B S, Lim Y P. The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115: 777-792.
- [23] Kim J S, Chung T Y, King G J, Jin M, Yang Y J, Jin Y M, Kim H I, Park B S. A sequence-tagged linkage map of *Brassica rapa*. *Genetics*, 2006, 174: 29-39.
- [24] Kapoor R, Banga S S, Banga S K. A microsatellite (SSR) base linkage map of *Brassica rapa*. *New Biotechnology*, 2009, 26(5): 239-243.
- [25] Qiu D, Gao M, Li G, Quiros C. Comparative sequence analysis for Brassica oleracea with similar sequence in *B. rapa* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 2009, 28: 649-661.
- [26] Schranz M E, Lysak M A, Mitchell-Olds T. The ABC's of comparative genomic in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes. *Trends in Plant Science*, 2006, 11: 535-542.
- [27] Lim G A, Jewell E G, Li X, Erwin T A, Love C, Batley J, Spangenberg G, Edwards D. A comparative map viewer integrating genetic maps for *Brassica* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 2007, 7: 40.
- [28] BrGP: [http://www.brassica-rapa.org/BGP/NC\\_brgp.jsp](http://www.brassica-rapa.org/BGP/NC_brgp.jsp)
- [29] Lei S L, Yao X Q, Yi B, Chen W, Ma C Z, Tu J X, Fu T D. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115: 643-651.
- [30] Huang Z, Chen Y F, Yi B, Xiao L, Ma C Z, Tu J X, Fu T D. Fine mapping of the recessive genic male sterility gene (*Bnms3*) in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115: 113-118.
- [31] Yi B, Chen Y N, Lei S L, Tu J X, Fu T D. Fine mapping of the recessive genic male-sterile gene (*Bnms1*) in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113: 643-650.

(责任编辑 曲来娥)