

大白菜细胞核显性雄性不育基因连锁标记的筛选

张淑江, 李 菲, 韩和平, 章时蕃, 钮心恪, 孙日飞

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 【目的】筛选出大白菜细胞核显性雄性不育基因的连锁标记, 利用该标记对显性不育基因跟踪、鉴定, 提高选择效率, 缩短转育周期, 加快育种进程。【方法】以大白菜细胞核显性雄性不育基因的分离群体 B00160([938A × 太 NB]-2X3-1X2) 的 115 个单株为试材, 采用 BSA 方法和 RAPD 技术, 对 400 个随机引物进行筛选。【结果】获得了一个与核基因显性雄性不育基因连锁距离为 1.74 cM 的 RAPD 标记 M264₃₀₀。将该多态性片段克隆、测序和序列分析, 设计了一对长 20 bp 的特异性引物, 成功地将 RAPD 标记转化成为 SCAR 标记 SM264₃₀₀。该标记与雄性不育基因的遗传连锁距离为 2.61 cM。利用该 SCAR 标记对另外 2 份育性分离群体的不育基因进行检测, 准确率达到 100%。

【结论】该标记可用于大白菜核显性不育基因转育过程中的辅助选择。

关键词: 大白菜; 雄性不育基因; RAPD 标记; SCAR 标记

Molecular Marker Linked to a Dominant Male Sterile Gene in Chinese Cabbage [*Brassica rapa* L.ssp *pekinensis*(Lour.)Olsson]

ZHANG Shu-jiang, LI Fei, HAN He-ping, ZHANG Shi-fan, NIU Xin-ke, SUN Ri-fei

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

Abstract: 【Objective】 Dominant genic male sterility has been playing an increasingly important role for efficient production of hybrids in Chinese Cabbage [*Brassica rapa* L.ssp *pekinensis* (Lour.) Olsson]. Using marker assisted selection of the dominant male sterile gene can accelerate breeding programs. 【Method】 Bulked segregant analysis was used to identify RAPD markers linked to a dominant male sterile gene in the population of 'B00160', a sterile and fertile segregating population in Chinese cabbage. 【Result】 One RAPD marker, M264₃₀₀ was identified in the segregating population tightly linked the gene. The polymorphic fragments were cloned and sequenced. A sequence characterized amplified region (SCAR) marker was developed based on the nucleotide sequence information. The SCAR marker showed the same size and pattern of segregation as the original RAPD marker with a map distance of 2.61 cM and the RAPD marker was converted into SCAR marker. 【Conclusion】 The marker developed here will facilitate the breeding for new elite homozygous sterile lines of Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage; Male sterile gene; RAPD marker; SCAR marker

0 引言

【研究意义】大白菜[*Brassica rapa* L.ssp *pekinensis* (Lour.) Olsson]杂种优势明显^[1]。雄性不育是生产大白菜一代杂种的理想系统, 20 世纪 70 年代初在中国就开始了大白菜雄性不育系选育的研究, 先后育成了隐性核基因雄性不育“两用系”、Ogura 萝卜胞质雄性不育系和 Polima 油菜胞质雄性不育系, 这些不育系

由于种种缺陷未能在生产上大面积推广应用^[2]。【前人研究进展】张书芳等利用显性不育系中的可育株给隐性不育系的不育株授粉获得了不育株率为 100% 的大白菜雄性不育系, 并在生产上应用。针对该细胞核雄性不育系统, 张书芳等提出了“双基因互作遗传假说”^[3], 冯辉等提出了“复等位基因遗传假说”^[4]。利用分子标记技术寻找与雄性不育性状有关基因连锁的标记, 为定位和克隆这些基因提供了极其有用的工具,

收稿日期: 2007-05-10; 接受日期: 2008-03-18

基金项目: 国家自然科学基金(30571273); 国家“863”计划(2006AA100108); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室项目

作者简介: 张淑江(1970-), 男, 北京人, 硕士, 研究方向为大白菜遗传育种。Tel: 010-82109548; E-mail: zhangshj@mail.caas.net.cn。通讯作者孙日飞(1959-), 男, 山东栖霞人, 研究员, 博士, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: rifei.sun@caas.net.cn

并为分子标记辅助育种打下良好的基础^[5~10]。国内外研究者对与雄性不育性状有关基因连锁的分子标记筛选上取得了较大的进展。Ying 等^[11]以白菜隐性核雄性不育系 ‘Aijiaohuang’ 与相应保持系 ‘Huangbaiqing’ 回交后代为试材, 利用 BSA 方法和 AFLP 技术对隐性核雄性不育基因进行遗传连锁图谱分析, 找到了 4 个与可育基因紧密连锁的特异性片段, 并转换成 STS 标记。沈向群等^[12]以稳定遗传的大白菜核基因显性不育甲型 “两用系” AB712 的不育株 (基因型为 MSMS) 和可育株 (基因型为 MS^fMS) 为试材, 筛选出一个与白菜核基因显性雄性不育育性恢复基因连锁的 RAPD 标记。邓晓辉等^[13]利用 RAPD 技术对不结球白菜 pol 系及其保持系基因组 DNA 的扩增图谱进行了比较, 获得了不育系的特异扩增片段, 并将其转化为稳定的 SCAR 标记。Ke 等^[14]、Hong 等^[15]、刘平武等^[16]、陆光远等^[17]、王道杰等^[18]、王俊霞等^[19]以甘蓝型油菜为材料, 筛选出与雄性不育性状有关基因连锁的分子标记。缪颖等^[20]筛选出了一个与白菜型油菜育性基因连锁的标记。王晓武等^[21~23]采用 BSA 分析法获得了一个与甘蓝显性雄性不育基因 (Ms) 连锁的 RAPD 标记, 并将其转化为稳定特异性强的 SCAR 标记, 此外, 通过把这个 RAPD 标记引物的 3' 末端添加碱基, 成功地把 RAPD 标记转化成为稳定的 ERPAR 标记。Sharma 等^[24]筛选出 2 个与芥菜细胞质雄性可育恢复基因连锁的 AFLP 标记, 并把其中一个转化成为 SCAR 标记。汪志伟等^[25]找到了一个与萝卜细胞质雄性不育恢复基因的 RAPD 标记。王春国等^[26]筛选出一个与花椰菜细胞质雄性不育系保持系特有的 RAPD 标记并把该标记转化成特异 PCR 标记。【本研究切入点】依据冯辉提出的 “复等位基因遗传假说”^[4], 在大白菜细胞核显性雄性不育系转育过程中, 需配套使用甲型、乙型 “两用系”, 分别转育, 不育株需等到植株通过春化、抽薹开花后才能鉴定。同时根据以往遗传研究及实际观察, 转育后代除了雄性不育基因外还存在显性上位可育基因, 不育性在当代可能不显现, 常规不育株的选择不得不通过自交后确认。因此, 转育过程复杂, 育种周期长。DNA 分子标记辅助选择是加快雄性不育选育的重要手段, 有关白菜细胞核雄性不育显性基因分子标记研究, 国内外报道较少。【拟解决的关键问题】本研究利用 RAPD、SCAR 分子标记技术, 对白菜细胞核雄性不育显性基因进行标记, 以期利用分子标记对显性不育基因跟踪、鉴定, 提高选择效率, 缩短转育周期, 加快育种进程。

1 材料与方法

1.1 试验群体的构建

试验材料为白菜雄性不育分离群体 B00160 ([938A × 太 NB]-2X3-1X2)。“938A” 是 100% 不育株率的大白菜雄性不育材料, 由沈阳市农业科学院提供。用本组自交不亲和系 ‘太 NB’ 与之杂交, 后代育性分离, 连续 2 代用系内可育株给不育株授粉, 后代育性仍然分离, 分离比率接近 1 : 1。分别提取该群体 115 个单株的 DNA, 其中不育单株 63 个, 可育单株 52 个。试验材料构建如图 1。

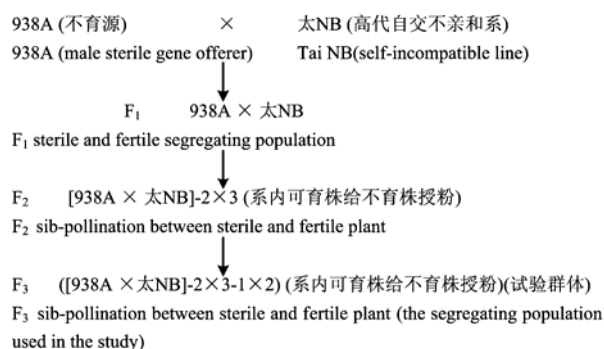


图 1 白菜雄性不育分离群体 B00160 的构建

Fig. 1 Process of constructing the sterile and fertile segregating population of B00160

1.2 基因组 DNA 的提取与建池

选取苗期植株的嫩叶片用 CTAB 方法提取单株总 DNA。DNA 浓度用琼脂糖电泳方法测定, 并将模板 DNA 浓度调整到 30 ng·μl⁻¹ 作为工作液, 随机各吸取 13 个可育单株和不育单株等量工作液混合成两个育性不同的 DNA 混合液 (DNA bulks)。

1.3 RAPD 引物与扩增

PCR 扩增选用 Operon 公司的 10 bp 的寡聚核苷酸的随机引物 OPA、OPB、OPL、OPM、OPN、OPO、OPQ、OPR、OPS、OPT、OPU、OPV、OPY、OPZ 共 290 个和上海生工合成的 110 个引物, S41-S50、S61-S70、S81-S90、S101-S110、S121-S130、S141-S150、S161-S170、S341-S350、S301-S310、S361-S370。共计 400 个。Taq DNA 聚合酶和 PCR 缓冲液为 Promega 公司生产; dNTPs 购自上海生物工程技术有限公司。RAPD 反应体系参照王晓武等^[21]的方法, 扩增反应总体积为 10 μl, 其中 Tris-HCl pH 8.0 终浓度为 10

mmol·L⁻¹, KCl 的终浓度为 50 mmol·L⁻¹, MgCl₂ 为 2.5 mmol·L⁻¹, dNTPs 为 0.25 mmol·L⁻¹, 引物为 0.2 mmol·L⁻¹; 模板 DNA 含量为 30 ng, Taq 酶为 1.0 U。用 20 μl 矿物油覆盖反应混合物进行 PCR 扩增。反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 38℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 循环 40 次, 最后一次延伸温度 72℃ 保持 7 min。扩增反应在 PTC-100 PCR 仪上进行。采用 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 5 ng·ml⁻¹ 溴化乙锭) 电泳检测, 紫外光下观察并照相。通过 JoinMap 3.0 软件进行连锁分析。

1.4 PCR 产物的回收纯化、转化、克隆、测序与引物合成

采用赛百盛 PCR 产物纯化试剂盒分离、回收、纯化目标 DNA 片段, 上海生物工程技术有限公司的 pUCm-T 载体 PCR 产物试剂盒连接回收目标 DNA 片段, 天为时代公司生产的 Top10 感受态细胞转化、克隆产物。操作方法和步骤详见各试剂盒说明。由北京九发金贝生物技术有限公司测序, 上海生物工程技术有限公司合成特异引物。

1.5 SCAR 扩增

进行 SCAR 扩增时各引物浓度为 0.1 μmol·L⁻¹, 退火温度为 60℃, 循环 30 次, 其它扩增条件和产物检测方法同上述 RAPD 扩增。

1.6 遗传连锁分析

通过 JoinMap 3.0 软件进行连锁分析。

2 结果与分析

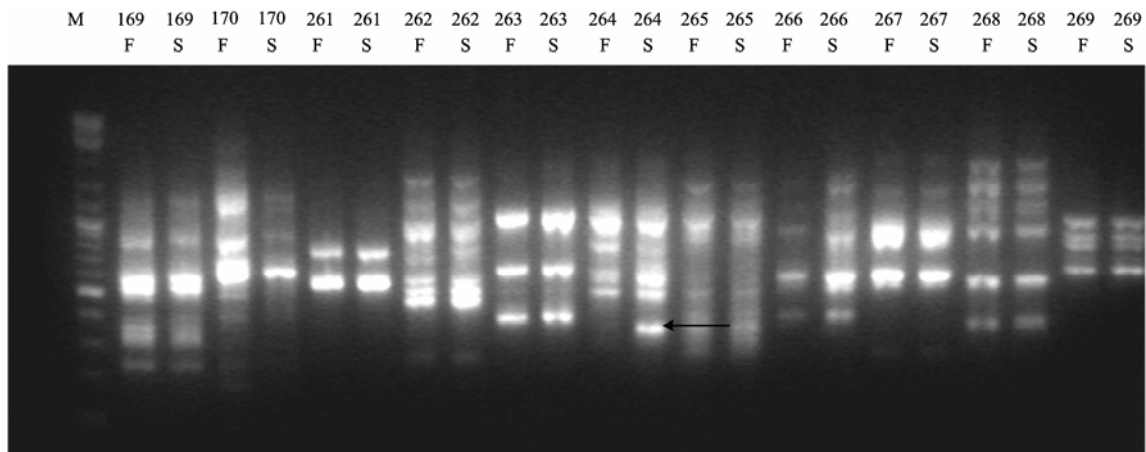
2.1 大白菜显性雄性不育基因 RAPD 标记的筛选

400 个引物中 371 个引物获得了扩增产物, 有效引物比例为 92.75%; 谱带总数为 1 638 条, 平均每个引物扩增出 4.1 条。引物 M264(5'-CAGAAGCGGA-3') 在 DNA 不育池中扩增出一条长约 300 bp 的谱带, 而在 DNA 可育池中不存在 (图 2)。进而对该引物利用建池单株重复扩增, 得到一致的结果 (图 3), 说明引物 M264 扩增的 300 bp 谱带在两个育性不同的 DNA 池之间表现稳定的差异, 命名为 M264₃₀₀。

为了明确 M264₃₀₀ 与显性不育基因之间的遗传距离, 对 B00160 所有 115 个单株进行 PCR 扩增, 结果表明, 63 个不育单株中, 61 个单株有强带, 2 个单株有弱带; 52 个可育单株中 50 个单株未出带, 2 个单株出现目标带。结果带标记的雄性不育、不带标记的雄性不育、带标记的雄性可育、不带标记的雄性可育表型比例为 63 : 0 : 2 : 50。根据分离比例, 该显性不育基因和标记 M264₃₀₀ 的重组率为 1.7%。通过 JoinMap 3.0 计算, 该标记与显性不育基因的遗传连锁距离为 1.74 cM。

2.2 测序与 SCAR 引物设计

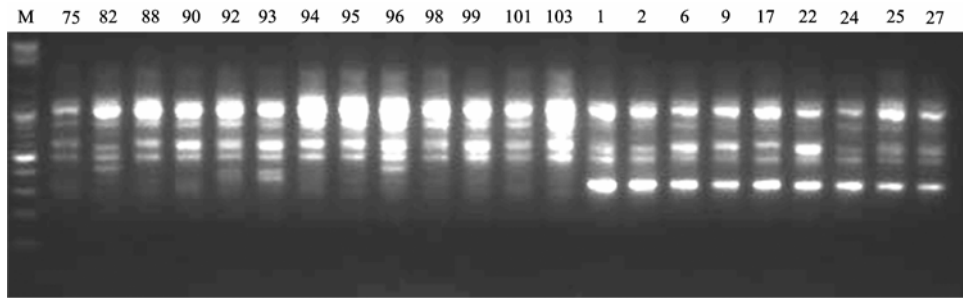
2.2.1 质粒的酶切检测 为了鉴定目的片段是否插入了 T-载体, 根据 T-载体两端多克隆位点的设计, 采用限制性内切酶 *Pst* I 对回收的质粒进行酶切处理。选



M: DNA 标准分子量; 169~269: 引物编号; 图中箭头所指的为引物 M264 在不育池中扩增出的特异谱带 M264₃₀₀; F: 可育; S: 不育
M: DNA ladder; 169-269: RAPD primer; Arrow indicates M264₃₀₀; F: Fertile; S: Sterile

图 2 可育池与不育池 RAPD 结果

Fig. 2 RAPD banding pattern of male fertile and male sterile DNA bulks with the primer M264



M: DNA 标准分子量; 75~103: 可育单株; 1~27: 不育单株
M: DNA ladder; 75-103: Male fertile plants; 1-27: Male sterile plants

图 3 RAPD 群体检测结果

Fig. 3 RAPD banding pattern of individuals from F_3 population

择在 ITPG/X-gal 平板上生长的白色菌落, 用牙签挑至含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37℃ 培养过夜。用上述白色菌落的菌液提取质粒, 用 *Pst* I 酶切和 PCR 扩增。由电泳结果可知, 10 份样品质粒中已插入目标片段。选择在 PCR 扩增产物检测中片段与对照片段长度最接近的 3 份样品 4 (1)、2-300-1、2-300-2 克隆进行测序。

2.2.2 测序 依据测序结果看, 3 份样品目标片段大小完全相同, 包含引物序列共 338 个碱基。4 (1) 和 2-300-2 样品 DNA 片段相同; 2-300-1 DNA 片段大小与 4 (1) 和 2-300-2 相同, 但碱基排列顺序不同, 说明不是同一条谱带。根据 4 (1) 和 2-300-2 样品 DNA 目标片段两端序列设计了一对引物 (不含 RAPD 引物序列): 上游引物序列 1: 5'-TAGAGCAGATCTCGGATCGA-3'。下游引物序列 2: 5'-TGGCTCAATCAAACAGTTGA-3' (图 4)。

```
5' NACNGCCGTAATACGACTCACTATAGGGCGACATATGATCGATGATATCCCATGGGCGG
CGCCTGCAGACCAGGTCTCAGAAGCGGATCTAGAGCAGATCTCGGATCGAATTTGGATCT
CAGATAATAAGTTACAGGCCTAGTTTTGCTTACAAAGTCTAGCTTGCTTGGCTAAAGAAT
CAACATTTCTAGGAAAGTGCTATTAGCATAGTGAAACTATAGTTACACGATCTTGATA
GAAAGTGAATGTCTCGCAGCATAGAGGAAACCTCCGTGTGATAAGCACTTGTGATGGTTT
TTCAGTAGACAAGTATATAACCCATTAATAAGCTTTTTGCAGTCAGTGATGAAATCCAC
ATTATGATATTGCAATGATTTCAACTGTTGATGAGCCACCGCCCTCCGCTTCTGAAGAC
TGGAGATCTGGATCCCTCGAGTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATC
ATGGTCATAGCTGTTTCCGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACG
AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAAGTCAACATTAATG
TGCCTGGCCTCACTGCCGCTTTTCANTCGGAAACCTGTCNNGCCANCTGNATTAATG
AATNNGCCAAANCCNCGGGNNAGCGGNTTTCNTNTNNGGNNCCNTNTTNCNCTTNN3'
```

下划线部分为 RAPD 引物序列
Underline is the sequence of RAPD primer

图 4 差异片段 4 (1) 的测序结果
Fig. 4 Sequence from RAPD fragment 4 (1)

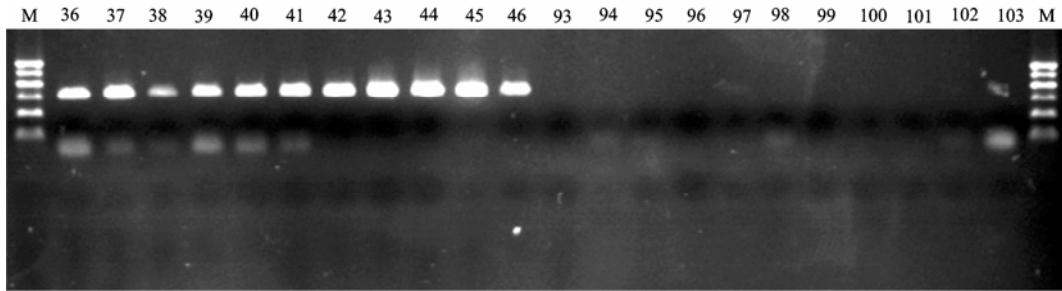
2.3 SCAR 标记扩增结果

设计的引物在退火温度 60℃, 30 个循环的条件下获得了良好的 SCAR 扩增结果, 扩增产物表现为单一谱带, 扩增片段长度与 M264₃₀₀ 完全相同, 将这对引物扩增的 SCAR 标记命名 SM264₃₀₀ (图 5)。随后对所有单株进行 SCAR 标记 PCR 扩增, 63 个不育单株中 60 个单株有带, 2 个无目标带, 1 个为弱带; 52 个可育单株中 51 个单株无带, 1 个单株有带。结果带标记的雄性不育、不带标记的雄性不育、带标记的雄性可育、不带标记的雄性可育表型比例为 61 : 2 : 1 : 51, 因此不育基因和标记 SM264₃₀₀ 的重组率为 2.6%, 该标记与雄性不育基因的遗传连锁距离为 2.61 cM。

根据 RAPD 标记 M264₃₀₀ 计算出的遗传连锁距离为 1.74 cM; 该标记转化成 SCAR 标记 SM264₃₀₀ 计算出的遗传连锁距离为 2.61 cM, 由于 SCAR 标记比 RAPD 标记在应用上稳定和可靠, 该标记与雄性不育基因的遗传连锁距离应认为是 2.61 cM。

2.4 SCAR 标记的检验

为了验证 SCAR 标记 SM264₃₀₀ 在显性雄性不育基因转育过程中辅助显性雄性不育选择的效果, 选取与 RAPD 标记筛选所用试材不同的 2 份育性分离群体: (938A × 太 NB) × 石-1 和 (938A × 太 NB) × ZY3, 其中 (938A × 太 NB) × 石-1 群体的 17 个单株和 (938A × 太 NB) × ZY3 群体的 23 个单株同时进行 SM264₃₀₀ 标记分析和雄性不育性调查。结果表明, 这 2 份育性分离群体利用该标记进行选择时预测的准确性达到 100%, 即该 SCAR 标记辅助选择的准确性达到 100%。这一结果表明该 SCAR 标记在大白菜显性不育基因的转育中可用于显性雄性不育基因的辅助选



M: DNA 标准分子量; 93~103: 可育单株; 36~46: 不育单株
M: DNA ladder; 93-103: Male fertile plants; 36-46: Male sterile plants

图 5 SCAR 标记群体检验结果

Fig. 5 Banding pattern of individuals with the SCAR primer

择。

3 讨论

冯辉等^[4]提出了大白菜核基因雄性不育“复等位基因遗传假说”，认为大白菜核基因雄性不育受细胞核同一位点 3 个复等位基因控制，Ms 为显性不育基因；ms 为 Ms 的等位隐性可育基因；Ms^f 为 Ms 的等位显性恢复基因。三者的显隐性关系为 Ms^f>Ms>ms。遗传模式如图 6。

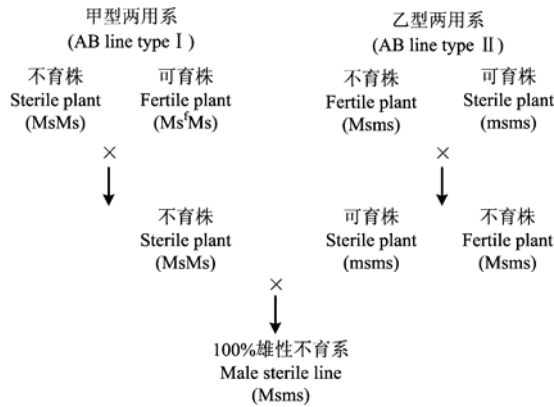


图 6 大白菜复等位遗传假说

Fig. 6 Multiple allele hypothesis in Chinese cabbage

根据冯辉等提出的“复等位基因遗传假说”，将基因型为[Ms^fMs^f]的高代自交系细胞核转育为甲型不育两用系[Ms^fMs]时，需要 100%不育株群体的不育株[Msms]作母本与自交系[Ms^fMs^f]杂交，后代有两种基因型[Ms^fMs]和[Ms^fms]，全部可育。继续用自交系[Ms^fMs^f]对基因型[MsMs^f]回交，后代同样有两种基因

型[Ms^fMs^f]和[Ms^fMs]，全部可育。为了选择[Ms^fMs]继续回交，必须对两种基因型进行测交，然后再回交。如果利用与显性核基因 Ms 紧密连锁的分子标记鉴定带有 Ms 的单株，就不需要测交，在当代就可以回交。既加快了回交速度，又可以节省人力物力。

RAPD 技术具有技术简单，对 DNA 需要量极少，对 DNA 质量要求不高，不需要接触放射性物质，成本低等特点，不足之处是一般表现为显性遗传，不能区分显性纯合和杂合基因型，因此提供的信息量不完全，另外，由于引物较短，RAPD 标记的 PCR 易受试验条件影响^[27]。本试验的结果证明，RAPD 标记是快速获得更稳定 SCAR 标记的一项有效手段。

4 结论

本研究利用 RAPD、SCAR 分子标记技术，筛选出一个与大白菜细胞核基因雄性不育显性基因紧密连锁的 RAPD 标记 M264₃₀₀，并成功地转化成稳定的 SCAR 标记 SM264₃₀₀。利用该 SCAR 标记对另外 2 份育性分离群体的不育基因进行检测，准确性达到 100%，该标记可用于大白菜核基因显性不育基因转育过程中的辅助选择。

References

[1] 何启伟, 郭素英. 十字花科蔬菜优势育种. 北京: 农业出版社, 1992.
He Q W, Guo S Y. *Hybrid Breeding of Cruciferae Vegetables*. Beijing: China Agriculture Press, 1992. (in Chinese)

[2] 孙日飞. 萝卜胞质大白菜雄性不育性的研究. 中国农业科学院博士研究生论文, 1999.
Sun R F. Investigation of Cold-Tolerant Ogura Cytoplasmic Male

- Sterility in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Dissertation for Ph.D of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 1999. (in Chinese)
- [3] 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)
- [4] 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 models 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 Agricultural University Press, 1995: 458-466. (in Chinese).
- [5] Li X L, Liu L K, Hou N, Liu G Q, Liu C G. SSR and SCAR markers linked to the fertility-restoring gene for a D2-type cytoplasmic male-sterile line in wheat. *Plant Breeding*, 2005, 124: 413-415.
- [6] Murakami S, Matsui K, Komatsuda T, Furuta Y. AFLP-based STS markers closely linked to a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley. *Plant Breeding*, 2005, 124: 133-136.
- [7] Lopez M T, Toojinda T, Vanaichit A, Tragoonrung S. Microsatellite markers flanking the *tms2* gene facilitated tropical TGMS rice line development. *Crop Science*, 2003, 43: 2267-2271.
- [8] Ahmadikhah A, Karlov G I. Molecular mapping of the fertility-restoration gene *Rf4* for WA-cytoplasmic male sterility in rice. *Plant Breeding*, 2006, 125: 363-367.
- [9] Nahm S H, Lee H J, Lee S W, Joo G Y, Harn C H, Yang S G, Min B W. Development of a molecular marker specific to a novel CMS line in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 1191-1200.
- [10] Wang Z W, Xiang C P, Mei S Y. Development of PCR-based markers linked to a restorer gene for cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.). *Euphytica*, 2006, 149: 211-219.
- [11] Ying M, Dreyer F, Cai D G, Jung C. Molecular markers for genic male sterility in Chinese cabbage. *Euphytica*, 2003, 132: 227-234.
- [12] 沈向群, 杨文骏. 大白菜核基因显性雄性不育系育性恢复基因的 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 the dominant genic male sterile lines in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(6): 731. (in Chinese)
- [13] 邓晓辉, 张蜀宁, 侯喜林, 陈沁滨. 不结球白菜 pol 胞质雄性不育系和其保持系的 RAPD 分析及分子标记筛选. 南京农业大学学报, 2007, 30(1): 19-22.
- Deng X H, Zhang S N, Hou X L, Cheng Q B. Analysis and identification of RAPD molecular markers linked to Pol CMS line and its maintainer line of non-heading Chinese cabbage. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2007, 30(1): 19-22. (in Chinese)
- [14] Ke L P, Sun Y Q, Hong D F, Liu P W, Yang G S. Identification of AFLP markers linked to one recessive genic male sterility gene in oilseed, *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 2005, 124: 367-370.
- [15] Hong D F, Wan L L, Liu P W, Yang G S, He Q B. AFLP and SCAR markers linked to the suppressor gene (*Rf*) of a dominant genetic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica*, 2006, 151: 401-409.
- [16] 刘平武, 李 赞, 何庆彪, 杨光圣. 甘蓝型油菜 pol CMS 育性恢复基因的分子标记. 中国油料作物学报, 2007, 29(1): 14-19.
- Liu P W, Li Y, He Q B, Yang G S. Identification of genetic markers for the pol CMS restorer gene in *Brassica napus* L. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2007, 29(1): 14-19. (in Chinese)
- [17] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 甘蓝型油菜显性细胞和雄性不育基因的 AFLP 标记. 作物学报, 2004, 30(2): 104-107.
- Lu G Y, Yang G S, Fu T D. Identification of AFLP markers linked to the dominant genic male sterility gene in *Brassica napus* L. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(2): 104-107. (in Chinese)
- [18] 王道杰, 郭嵩光, 李殿荣, 田建华. 油菜单显性核雄性不育基因的分子标记. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(5): 513-518.
- Wang D J, Guo A G, Li D R, Tian J H. Molecular markers linked to mono-dominant genic male sterile gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(5): 513-518. (in Chinese)
- [19] Wang J X, Yang G S, Fu T D, Meng J L. Development of PCR-based markers linked to the fertility restorer gene for the polima cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(11): 1012-1017.
- [20] 缪 颖, 陈林娇, 陈德海, 张祖滨. 应用 bulked-DNA 寻找白菜型油菜核雄性不育基因的 RAPD 标记. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39(5): 682-685.
- Miao Y, Chen L J, Chen D H, Zhang Z B. Molecular marker of genic male sterile gene in *Brassica campestris* using bulked segregated analysis-RAPD. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2000, 39(5): 682-685. (in Chinese)
- [21] 王晓武, 方智远, 孙培田, 刘玉梅, 杨丽梅. 一个与甘蓝显性不育基因连锁的 RAPD 标记. 园艺学报, 1998, 25(2): 197-198.

- Wang X W, Fang Z Y, Sun P T, Liu Y M, Yang L M. Identification of a RAPD marker linked to a dominant male sterile gene in cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 1998, 25(2): 197-198. (in Chinese)
- [22] 王晓武, 方智远, 孙培田, 刘玉梅, 杨丽梅, 庄 木. 一个用于甘蓝显性雄性不育基因转育辅助选择的 SCAR 标记. *园艺学报*, 2000, 27(2): 143-144.
- Wang X W, Fang Z Y, Sun P T, Liu Y M, Yang L M, Zhuang M. A SCAR marker applicable in marker assisted selection of a dominant male sterility gene in cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(2): 143-144. (in Chinese)
- [23] Wang X W, Fang Z Y, Huang S W, Sun P T, Liu Y M, Yang L M, Zhuang M, Qu D Y. An extended random primer amplified region (ERPAR) marker linked to a dominant male sterility gene in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Euphytica*, 2000, 112: 267-273.
- [24] Sharma A, Bhat S P. Identification of AFLP markers linked to the male fertility restorer gene of CMS (*Moricandia arvensis*) *Brassica juncea* and conversion to SCAR marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114: 385-392.
- [25] 汪志伟, 向长萍, 梅时勇, 黄来春. 萝卜细胞质雄性不育恢复基因的 RAPD 标记. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(2): 153-155.
- Wang Z W, Xiang C P, Mei S Y, Huang L C. RAPD marker of restorer gene for cytoplasmic male sterility in radish. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2004, 5(2): 153-155. (in Chinese)
- [26] 王春国, 李 蕙, 宋文芹. 细胞质雄性不育花椰菜保持系特异分子标记的鉴定及序列分析. *分子细胞生物学报*, 2006, 39(3): 236-242.
- Wang C G, Li H, Song W Q. Identification and analysis of the specific molecular marker associated with fertile maintenance of cytoplasmic male sterility cauliflower. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2006, 39(3): 236-242. (in Chinese)
- [27] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种. 北京: 科学出版社, 2001.
- Fang X J, Wu W R, Tang J L. *DNA Marker-assisted Breeding in Crops*. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)