

大白菜永久高密度分子遗传图谱的构建

张立阳^{1,2} 张凤兰^{1*} 王 美¹ 刘秀村¹ 赵岫云¹ 薛林宝²

(¹北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089; ²扬州大学农学院园艺系, 扬州 225009)

摘 要: 以大白菜高抗 TuMV 白心株系 91-112 和高感 TuMV 桔红心株系 T12-19 为亲本建立的小孢子培养 DH 系作为图谱构建群体, 构建了包含 10 个连锁群、406 个标记位点的分子连锁图谱, 图谱总长度 826.3 cM, 标记间的平均图距为 2.0 cM, 连锁群数目和染色体数相等。每个连锁群上的标记数在 7~111 个之间, 连锁群的长度在 26.4~156.1 cM 的范围内, 平均图距在 1.0~3.8 cM 之间。该连锁图谱包括 246 个 AFLP 标记、135 个 RAPD 标记、11 个 SSR 标记和 12 个同工酶标记、1 个 SCAR 标记和 1 个形态标记。

关键词: 大白菜; 分子标记; 遗传图谱; DH 群体

中图分类号: S 634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 02-0249-07

A Linkage Map Construction for Chinese Cabbage Based on AFLP, SSR, RAPD and Isozyme Markers Using DH Population

Zhang Liyang^{1,2}, Zhang Fenglan^{1*}, Wang Mei¹, Liu Xiucun¹, Zhao Xiuyun¹, and Xue Linbao²

(¹ National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100089, China; ² Horticultural Department, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: A molecular genetic map for Chinese cabbage was constructed based on AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), SSR (Simple Sequence Repeat) and isozyme markers. Marker analysis was performed on 100 randomly chosen DH lines obtained by microspore culture from the F_1 between two homozygous parents: 91-112 and T12-19. 406 markers including 246 AFLP markers, 135 RAPD markers, 11 SSR markers, 12 isozyme markers, 1 SCAR and 1 morphological marker were integrated into 10 groups using JoinMap 3.0. It covered 826.3 cM with a mean marker interval of 2.0 cM. Number of markers included in linkage groups varied from 7 to 111, mean marker interval distance from 1.0 cM to 3.8 cM and the length of linkage groups from 26.4 cM to 156.1 cM individually. A total of 45.0% distorted markers distributed in the map. The molecular genetic map constructed in this study would be useful in gene localization, comparative genomes research and QTL mapping of important agronomic traits for Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage; Molecular marker; Genetic linkage map; Double haploid (DH)

大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) 原产我国, 是我国蔬菜栽培中分布最广、种植面积最大的蔬菜作物之一, 其遗传学和分子生物学研究一直受到高度重视。分子连锁图谱为进行植物基因组的结构分析和比较提供了有力工具。较高密度的分子图谱已有效的应用于数量性状的基因定位、比较基因组研究和分子标记辅助育种等研究中。关于大白菜 (种) 遗传图谱的构建, 国内外先后有 Song 等^[1]、Teutonico 等^[2]、Ajisaka 等^[3]、Tanhuanpaa 等^[4]、Matsumoto 等^[5]、张鲁刚等^[6]、于拴仓等^[7]报道。但上述研究主要存在 4 个问题: 第一, 使用的标记主要为 RFLP 和 RAPD 标记。RFLP 标记较为复杂, 探针难以获得, 不易进行大量单株筛选; RAPD 标记虽易于操作, 但其稳定性较差。AFLP 技术结合了 RFLP 和 RAPD 的特点, 稳定性较好, 在一次 PCR 反应中能同时检测多个遗传位点,

收稿日期: 2004 - 06 - 02; 修回日期: 2004 - 10 - 16

基金项目: 北京市科技新星项目 (954812900); 国家 '863' 项目 (2001AA241124, 2002AA207012)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangfenglan@nerv.com)

信息量非常丰富。SSR标记所揭示的多态性也十分丰富,相对于RAPD,重复率和可信度高,逐渐成为遗传标记中的研究热点。第二,目前构建的遗传图谱大多利用亚种间杂交获得的群体,对于指导育种来说,选用品种间杂交组合更贴近育种目标,可以获得许多重要农艺性状完整的遗传信息。第三,图谱的密度不高,目前大白菜品种间组合所获得的图谱标记密度低,尚不能满足农艺性状定位和基因组研究的要求。第四,大多数图谱是利用 F_2 群体构建的,为非永久性群体无法继续将其饱和,很难与其它实验室合作进行比较研究,同时很难准确地对大白菜数量性状进行定位。采用永久群体如DH群体与重组自交系进行分子图谱的构建已成为国际上的主流方向。

本研究对大白菜普通白心株系91-112和桔红心株系T12-19杂交 F_1 进行游离小孢子培养,以得到的100个DH株系为作图群体^[8],采用AFLP标记、SSR标记、RAPD标记、同工酶标记、SCAR和形态标记等,构建了永久高密度的大白菜分子连锁图谱,可为重要农艺性状的基因定位和标记辅助育种研究参考。

1 材料和方法

大白菜普通白心株系91-112为连续自交9代的高代自交系,球心为白色,叶面较平,叶球叠抱,高抗芜菁花叶病毒(TuMV)。T12-19是通过对北京地方品种和日本引进品种的杂种 F_1 进行小孢子培养得到的双单倍体株系,球心为桔红色,植株生长势弱,高感芜菁花叶病毒。对91-112和T12-19的 F_1 进行小孢子培养,得到100个双单倍体株系,作为白菜构建连锁图谱的分离群体。

采用CTAB法提取基因组DNA,按Murry等^[9]的方法进行。同工酶的提取方法参照王中仁^[10]的方法。

参照Vos的方法^[11]进行AFLP分析,AFLP试剂盒购自美国GBCO-BRL公司,AFLP分析参照试剂盒说明书进行,稍有改动,反应体积减半。AFLP扩增产物在EC160 DNA测序电泳槽(Bio-Rad, America)上分离,利用银染方法进行分析。

RAPD反应体系为25 μ L,包括2.5 μ L 10 \times buffer, 2.0 μ L 25 mmol/L $MgCl_2$, 2.0 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 1 U TaqDNA聚合酶, 30 ng引物, 50 ng模板DNA。热循环程序为:94 预变性 4 min, 然后94 15 s, 37 30 s, 72 75 s下循环45次, 72 延伸 7 min后保存在4 条件下。采用1.4%琼脂糖(含0.5 mg/L EB)凝胶, 80 V电泳2 h。用Kodak EDAS-120凝胶成像系统照相分析。

SSR引物序列参照Szewc等^[12]引物序列由Sangon公司合成。20 μ L反应体系含有1 \times PCR buffer, 3.125 mmol/L $MgCl_2$, 0.25 mmol/L dNTPs, 1.0 μ mol/L引物, 30 ng模板DNA, 1 U TaqE。反应程序为:94 预变性 2 min, 94 变性 60 s, 68 退火 30 s, 72 延伸 45 s, 进行2个循环,以后每2个循环降低退火温度1 直到58 ,最后94 变性 60 s, 58 退火 30 s, 72 延伸 45 s进行20个循环。扩增产物用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 55 W预电泳1 h后, 60 W电泳约1.5 h,直至二甲苯青跑到胶的2/3处为止,停止电泳,进行银染分析。

同工酶分析采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳,凝胶制备参照周顺伍的^[13]的方法,分离胶的浓度是7%,浓缩胶浓度是3%,在4 条件下300 V恒压电泳。染色参照王中仁^[10]的方法进行。用10%的甘油制成干胶保存或照相记录电泳结果。

数据整理将各个株系的带型按亲本类型分类,与91-112带型相同者赋值为A,与T12-19带型相同者赋值为B,由各种原因造成的数据不清或缺失者赋值为“-”。根据与100 bp DNA ladder标准谱带的相对位置,估计多态性条带的分子量大小。RAPD和SSR标记名称用引物名称加扩增片段的碱基长度表示,由于AFLP采用的是(E+A)/(M+C)组合,所以AFLP标记用引物中后两个选择性碱基组合加扩增片段大小表示。两个选择性碱基组合之间用“-”分开。

连锁分析利用JoinMap 3.0^[14,15]软件构建大白菜遗传图谱。先用“New project”命令创建一个新的文件,用“Load data”命令导入数据;然后,在“Individual genot freq”下排除缺失数据过多的

单株，在“Locus genot freq”下分析标记的偏分离情况；最后将 LOD 值的范围设定为“2”到“10”，用“Group”命令进行分组；选用“Kosambi”函数计算图距，用“Map”命令构建连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 分子标记多态性

利用亲本与 F_1 代进行 AFLP 引物组合的筛选，最后从 64 对引物中筛选出 20 对条带清晰、多态性高的引物组合进行 AFLP 分析。20 对引物共产生 810 个条带，平均每个引物扩增出 40.5 条带。810 个位点中 263 个位点在双亲间具有多态性，占 32.5%。263 个多态性位点中有 26 个标记为共显性标记，占 9.9%。

对 462 个 RAPD 引物进行分析，筛选出在双亲间稳定表现多态的引物 99 个。其共产生 406 条扩增谱带，平均每个引物扩增 4.1 条带，其中多态性谱带 150 条，占 32.5%。150 个多态位点中有 2 个共显性标记，占 1.3%。

对 15 个 SSR 引物对进行分析，其中 6 对引物产生的扩增产物多态性明显，带型清晰且稳定性好。6 对 SSR 引物共产生 17 个多态性位点，多态率为 2.8 条/引物对。

通过对天冬氨酸转氨酶（AAT）、苹果酸脱氢酶（MDH）、苹果酸酶（ME）、乳酸脱氢酶（LDH）、磷酸葡萄糖变位酶（PGM）、甲酸脱氢酶（FDH）、谷氨酸脱氢酶（GDH）7 种同工酶进行电泳分析，得到在双亲间表现差异的谱带 14 条，其中共显性标记 10 个，占 71.4%。

2.2 遗传图谱的构建

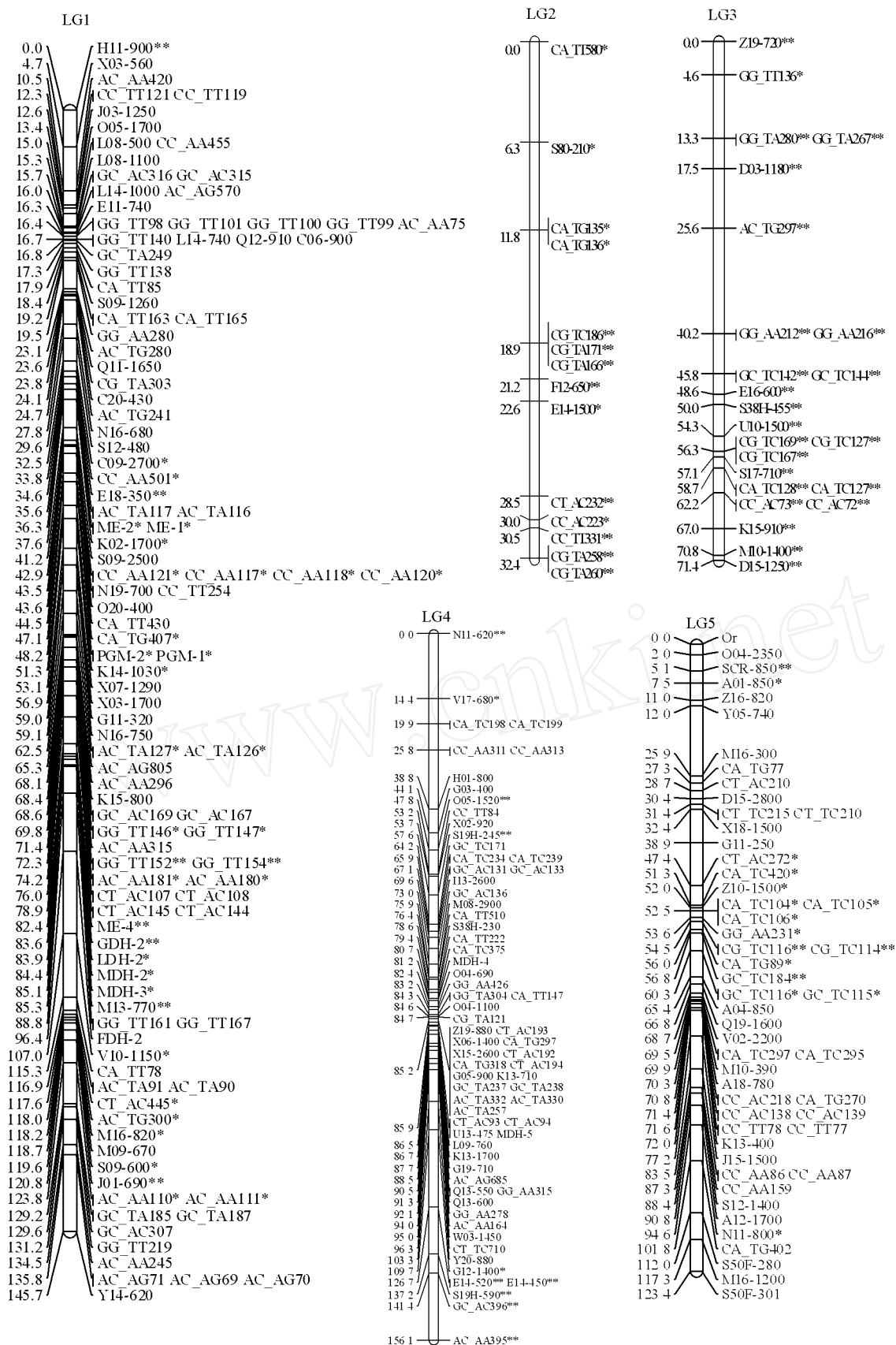
对 446 个多态性标记进行分析构图，得到包含 406 个标记、10 个连锁群的遗传图谱（图 1，表 1），其中包括 246 个 AFLP 标记，135 个 RAPD 标记，11 个 SSR 标记、12 个同工酶标记、1 个 SCAR 标记和 1 个形态标记。连锁群数目和大白菜的染色体数相等，连锁图编号为 LG1 到 LG10，总长度为 826.3 cM，标记间平均图距为 2.0 cM。每个连锁群上的标记数在 7~111 个之间，连锁群的长度在 26.4~156.1 cM 的范围内，平均图距在 1.0~3.8 cM 之间。406 个分子标记中，来自父本的标记为 222 个，占 54.7%，来自母本的为 184 个，占 45.3%，符合 1:1 的理论分离比。各位点上，91-112 的基因频率为 79.6%~23.7%，平均为 51.65%；T12-19 的基因频率为 20.4%~76.3%，平均为 48.35%。所以，亲本在群体中的分离比例接近，说明该群体总体上没有出现严重的偏分离。

试验分析的 446 个标记中，有 9.0% 的标记未进入连锁群，包括 17 个 AFLP 标记、15 个 RAPD 标记、6 个 SSR 标记和 2 个同工酶标记（表 1）。10 个连锁群中，LG1 包含的标记最多，有 111 个，LG8 最少，只有 7 个。标记在 LG1、LG4 和 LG5 上的分布不均匀，分别出现不同程度的标记密集区，尤其是 AFLP 标记；其余连锁群上的标记分布比较均匀，只有 0~3 个间距大于 10 cM 的空隙。LG8 的平均图距最大，为 3.77 cM；LG6 的平均图距最小，为 1.0 cM（表 2）。

表 1 构建遗传图谱的分子标记

Table 1 Molecular markers used for genetic map construction

分子标记 Molecular marker	多态性标记数/引物对 Number of polymorphic markers/primer combination	偏分离标记数 Number of distorted markers	偏分离标记比率 Rate of distorted markers(%)	连锁标记数 Number of linked markers	未连锁标记数 Number of unlinked markers	未连锁标记比例 Rate of unlinked markers(%)
AFLP	263/20	116	47.1	246	17	6.5
RAPD	150/99	50	37.0	135	15	10.0
SSR	17/6	6	54.5	11	6	35.3
同工酶 Isozyme	14/-	10	83.3	12	2	14.3
SCAR	1/-	0	0	1	0	0
形态标记 Morphological marker	1/-	0	0	1	0	0
合计 Total	446/125	182	45.0	406	40	9.0



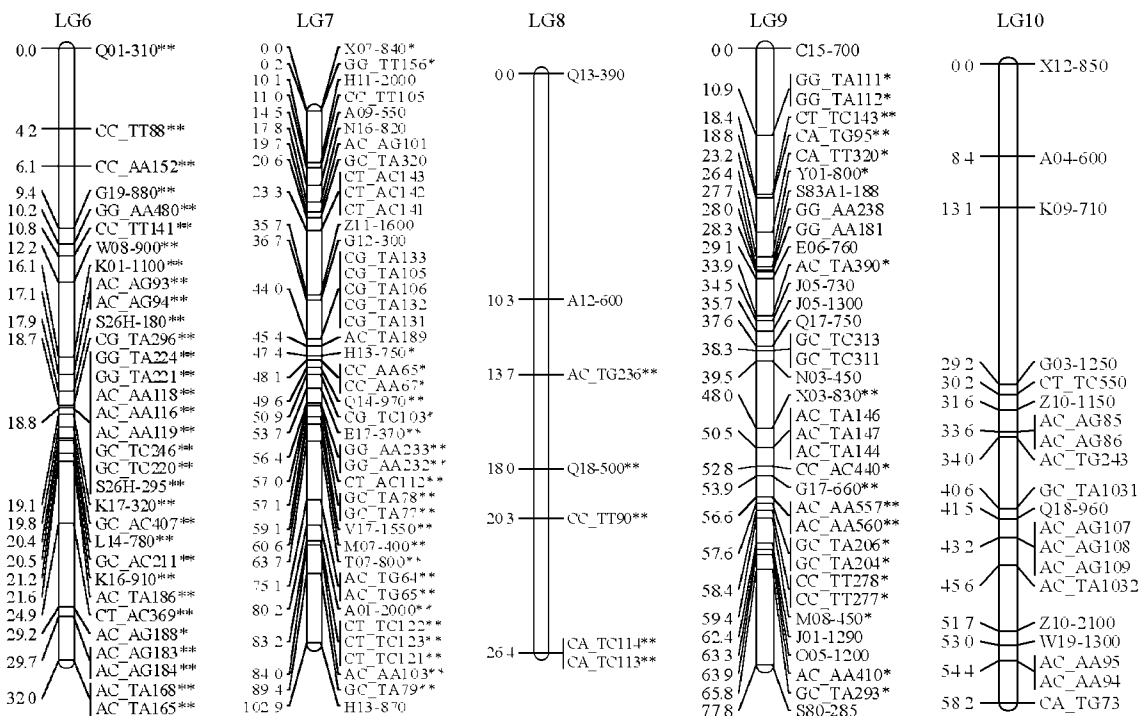


图 1 用 DH 群体构建的大白菜分子连锁图

“*”和“**”表示标记的分离偏离理论分离比例 1:1, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ 。

Fig 1 The linkage map constructed with DH population in Chinese cabbage

“*” and “**” indicate markers showing deviations from the expected 1:1 segregation ratio, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$.

2.3 偏分离分析

连锁图上的所有 406 个标记位点中, 在 1% 水平上有 112 个位点不符合孟德尔分离比例, 即表现极显著偏分离, 比率为 27.2%; 在 5% 水平上有 70 个位点偏离孟德尔分离比例, 即表现显著偏分离, 比率为 17.3%。所有偏分离的标记中, 偏向 91-112 者占 66.5%, 偏向 T12-19 者占 33.5%。从偏分离位点的分布来看, 除了 LG10 没有偏分离位点外, 其余均有, 其中 LG2、LG3 和 LG6 均为偏分离标记。大部分偏分离标记在连锁群上表现为多个位点集中分布, 如 LG9 的两端, LG7 的下半部分。LG2、LG3、LG8 和 LG9 上的偏分离标记全部偏向 91-112, LG6 上的偏分离标记全部偏向 T12-19, 其余连锁群中除了 LG10 外, 大部分偏向 91-112 (表 1、表 2)。

表 2 分子标记在遗传图谱上的分布

Table 2 Distribution of molecular markers on linkage map

连锁群 Linkage group	LOD 值 LOD score	长度 Length (cM)	标记数 Number of markers	平均距离 Average distance (cM)	偏 T12-19 标记数 Number of markers distorted to T12-19	偏 91-12 标记数 Number of markers distorted to 91-12	偏分离标记数 Number of distorted markers
LG1	9	145.7	111	1.3	13	24	37
LG2	9	32.4	14	2.3	0	14	14
LG3	7	71.4	24	3.0	0	24	24
LG4	8	156.1	68	2.3	1	10	11
LG5	8	123.4	52	2.4	13	3	16
LG6	8	32.0	32	1.0	32	0	32
LG7	7	102.9	42	2.5	2	22	24
LG8	4	26.4	7	3.8	0	5	5
LG9	3	77.8	36	2.2	0	19	19
LG10	9	58.2	20	2.9	0	0	0
总计 Total	-	826.3	406	2.0	61	121	182

3 讨论

本研究主要利用 AFLP、RAPD、SSR和同工酶标记构建大白菜连锁图谱,由结果可知多态性检出效率: AFLP>SSR>RAPD。说明 AFLP是一种多态性丰富,高通量的分子标记类型,对于构建图谱和增加图谱密度是高效的。这与 McGregor^[16]的试验结果一致。

本研究所得到的大白菜遗传图谱总长度为 826.3 cM,约为 Song等^[11](1850 cM, 280个标记)和 Teutonico等^[21](1785 cM, 139个标记)所构建图谱的 1/2。笔者认为图谱大小除与基因组大小有关外,尚与所用材料和群体的种类有关。构建的遗传图谱大小与作图群体双亲间遗传差异的大小密切相关,当双亲间遗传距离大,差异位点多,且在染色体上分布均匀时,构建的遗传图谱较长,也更接近基因组实际。本研究中采用 91-112和 T12-19两个大白菜品种间杂交产生的 DH群体为作图群体,是导致覆盖基因组较小的原因之一。此外,由于本研究中的主要标记为 *EcoRI* H_{se}I AFLP标记,其在染色体上的簇状排列可能是导致基因组覆盖面积小的又一原因。*EcoRI* H_{se}I AFLP标记检测的位点多聚集在着丝粒两侧甲基化较高的重复序列区域,标记聚集而形成“簇”,这种现象可能与异染色质区重组率低有关。该缺陷可以利用不同分子标记特性的互补来弥补,如 *PstI* H_{se}I AFLP标记, *PstI*可以在非甲基化的常染色质区识别酶切位点,另外在连锁图中增加 RFLP标记可以增加标记在染色体上分布的均匀性和图谱的稳定性。

本研究中偏分离标记的频率(45.0%)比芸薹属其他研究(Teutonico等, 23%; Chyi等, 24%)^[2,17]中的频率高。异常分离现象在自然界中普遍存在,在远缘杂交组合的分离群体及 DH和 RI群体中尤为明显。导致偏分离现象的原因很多,主要有:(1)由配子体或孢子体不同发育阶段基因型的选择所造成。Ajisaka等^[18]曾对 *B. campestris*的游离小孢子培养过程中 F₂代单株胚状体发生能力与 RAPD标记分离相关性进行研究。结果表明,多数 RAPD标记出现偏分离频率与胚状体发生能力成正相关,这从一个侧面证实了配子体或合子的选择性是形成偏分离的主要原因。(2)由小孢子培养和植株再生过程的选择压造成。DH群体来自雄配子体的花粉培养,花粉培养导致的偏分离可能偏向高花粉培养反应能力的亲本,这在玉米和白菜的 DH群体中已有报道^[19,22]。(3)由于遗传搭车效应,与影响偏分离的遗传因子紧密连锁的分子标记表现为严重的偏分离。(4)与 F₂群体相比, DH群体中隐性有害基因的选择压增大,很可能导致偏分离的发生。此外,环境因素和群体的随机效应也会引起偏分离。对芸薹属作物曾有偏分离标记集中分布于某几个连锁群的特定区域内,并明显偏向某一亲本类型的研究报道^[20]。本研究中, LG2、LG3、LG8和 LG9上的偏分离标记全部偏向 91-112, LG6上的偏分离标记全部偏向 T12-19,该结果与 Moriguchi^[21]的研究结果相似。利用 JoinMap 3.0中软件构建连锁图谱,“Map”命令对每个连锁群根据标记间连锁的紧密程度进行 1~3次不等的标记添加,对于含有较多偏分离标记的连锁群不宜采用经过 3次添加才构成的,以选取第 2次添加后所得的连锁群为宜,这样既可避免丢失有效标记,又可避免由于过多添加偏分离标记导致连锁图失去真实性。

综上所述,对于具有重要经济价值的大白菜来说,构建一张永久高密度的遗传连锁图具有重要的意义。本研究采用永久群体(双单倍体群体)、利用 AFLP、RAPD、SSR和同工酶等多种分子标记构建了高密度大白菜分子遗传图谱,标记间的平均距离只有 2.0 cM,可为今后进行白菜重要性状精细的 QTL(数量性状位点)定位作参考。

参考文献:

- 1 Song KM, Suzuki J Y, Solcum M K, Williams P H, Osborn T C. A linkage map of *B. russica napus* (syn. *campestris*) based on restriction fragment length polymorphism loci. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 296~304
- 2 Teutonico R A, Osborn T C. Mapping of RFLP and qualitative trait loci in *B. russica napus* and comparison to the linkage maps of *B. napus*, *B. oleracea* and *A. thaliana*. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 885~894
- 3 Ajisaka H, Kuginuki Y, Hida K, Enomoto S, Hirai M. A linkage map of DNA markers in *B. russica campestris*. *Breed Sci*, 1995, 45

- (Suppl): 195
- 4 Tanhuanpaa P K, Vilkki J P, Vilkki H J. A linkage map of spring tumip rape based on RFLP and RAPD markers. *Agricultural and Food Science in Finland*, 1996, 5: 209 ~ 217
 - 5 Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*B. brassica nap* ssp. *pekinensis*). *Euphytica*, 1998, 104 (2): 79 ~ 86
 - 6 张鲁刚, 王 鸣, 陈 杭, 刘 玲. 中国白菜 RAPD 分子连锁图谱的构建. *植物学报*, 2000, 42 (5): 485 ~ 489
Zhang L G, Wang M, Chen H, Liu L. Construction of RAPD's molecular genetic map of Chinese cabbage. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42 (5): 485 ~ 489 (in Chinese)
 - 7 于拴仓, 王健, 郑晓鹰. 大白菜分子遗传图谱的构建与分析. *中国农业科学*, 2003, 36 (2): 190 ~ 195
Yu S C, Wang Y J, Zheng X Y. Construction and analysis of a molecular genetic map of Chinese cabbage. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36 (2): 190 ~ 195 (in Chinese)
 - 8 张凤兰, 赵岫云. 用小孢子培养创建大白菜双单倍体作图群体. *华北农学报*, 2003, 18 (4): 74 ~ 77
Zhang F L, Zhao X Y. Establishing double haploid population with microspore culture for genetic mapping in Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2003, 18 (4): 74 ~ 77 (in Chinese)
 - 9 Murry H G, Thompson W F. Rapid isolation of weight DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321 ~ 4322
 - 10 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996. 82 ~ 85, 91 ~ 102
Wang Z R. Plant allozyme analysis. Beijing: Beijing Science Press, 1996. 82 ~ 85, 91 ~ 102 (in Chinese)
 - 11 Vos P, Hogers R, Blecker M, Rigans M, Lee T, Homes M, Friters A, Pot J, Peleman J, Kniper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4407 ~ 4414
 - 12 SzeWC Fadden A K, Kresovich S, Bliet S M, Mitchell S E, Mcferson J R. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *B. brassica* species. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 534 ~ 538
 - 13 周顺伍. 基础生化试验技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1989. 100 ~ 200
Zhou S W. Biochemical experimental techniques. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1989. 100 ~ 200 (in Chinese)
 - 14 Stam P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J*, 1993, 3: 739 ~ 744
 - 15 Stam P, Van Ooijen J W. JoinMap (tm) version 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen, The Netherlands, 1995. 1 ~ 51
 - 16 McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M, Louw J H, Wamich L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, SSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 2000, 113: 135 ~ 144
 - 17 Chyi Y S. A genetic linkage map of restriction fragment length polymorphism loci for *B. brassica nap* (syn. *campestris*). *Genome*, 1992, 35: 746 ~ 757
 - 18 Ajisaka H, Kuginuki Y, Shiratori M, Ishiguro K, Enomoto S, Hirai M. Mapping of loci affecting the cultural efficiency of microspore culture of *B. brassica nap* L. syn. *campestris* L. using DNA polymorphism. *Breed Sci*, 1999, 49: 187 ~ 192
 - 19 Beaumont V H, Rocheford T R, Widholm J M. Mapping the anther culture response genes in maize (*Zea mays* L.). *Genome*, 1995, 38: 968 ~ 975
 - 20 Lincoln S E, Daly M J, Lander E S. Constructing genetics maps with MAPMAKER/EXP 3.0 b. A Whitehead Institute Technical Report, 2nd ed. 1993, 1 ~ 100
 - 21 Moriguchi K. A genetic map based on RAPD, RFLP, isozyme morphological markers and QTL analysis for clubroot resistance in *B. brassica oleracea*. *Breeding Science*, 1999, 49 (4): 257 ~ 265
 - 22 Zhang F L, Aoki S, Takahata Y. RAPD markers linked to microspore embryogenic ability in *B. brassica* crops. *Euphytica*, 2003, 131: 207 ~ 213