

大白菜细菌人工染色体文库的构建及鉴定

冯大领^{1,2}, 石学萍¹, 杨煜³, 王彦华¹, 轩淑欣¹, 赵建军¹, 申书兴^{1,*}

(¹河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001; ²河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001; ³山东省农业科学院高新技术研究中心, 济南 250100)

摘要: 以我国优良的大白菜自交系‘85-1’为材料, 利用 pIndigoBAC-5 为载体, 通过对高分子量 DNA 的制备、大片段 DNA 的选择、连接转化条件等几个方面的优化, 构建了大白菜细菌人工染色体文库。该文库由 57 600 个克隆组成, 平均大小为 98.4 kb, 空载率为 1.5%; 覆盖大白菜基因组 10.3 倍; 挑取 6 个克隆培养 5 d 后, 经 HindIII 完全酶切检测, 其指纹图谱稳定一致。大白菜细菌人工染色体文库的构建为重要功能基因的克隆和定位及比较基因组研究奠定了基础。

关键词: 大白菜; 细菌人工染色体文库; 插入片段; 稳定性

中图分类号: S 634.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 01-0151-08

Construction and Characterization of a Bacterial Artificial Chromosome Library from Chinese Cabbage

FENG Da-ling^{1,2}, SHI Xue-ping¹, YANG Yu³, WANG Yan-hua¹, XUAN Shu-xin¹, ZHAO Jian-jun¹, and SHEN Shu-xing^{1,*}

(¹College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; ²College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; ³High-tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

Abstract: A bacterial artificial chromosome library of *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson (Chinese cabbage) was constructed from inbred line ‘85-1’ with the vector pIndigoBAC-5. The key processes of the construction, such as preparation of high molecular weight DNA, selection of digested fragments, condition of ligation and transformation, were studied. The library consists of 57 600 clones in which the average insert size is about 98.4 kb and the empty clones are about 1.5%. The library represents an equivalent of 10.3 fold size of Chinese cabbage genome. Six clones randomly picked from this library show no HindIII fingerprint changes after 5 days’ successive culture, which indicates that the clones in the library are stable. The library will lay the foundation for gene clone, location and comparative genomics research of *Brassica*.

Key words: Chinese cabbage; bacterial artificial chromosome library; insert fragment; stability

收稿日期: 2010-08-23; **修回日期:** 2010-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871713); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20101302110001); 河北省自然科学基金项目 (C2010000738); 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目 (08965514D)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: shensx@hebau.edu.cn)

致谢: 本试验得到了山东省农业科学院高新技术研究中心李广存博士以及河北农业大学王省芬教授、张娜博士的指导, 在此表示感谢。

构建基因组文库是从 DNA 水平上对各种生物进行研究的平台, 基因组文库是永久保存基因资源的最好方法, 也是进行基因组结构和功能研究的基础。细菌人工染色体文库(Bacterial artificial chromosome library, BAC 文库)具有插入片段大、稳定性强、易于操作等优点, 是应用最广泛的基因组文库。目前已经在多种植物中成功构建, 如拟南芥(Choi et al., 1995)、水稻(彭开蔓 等, 1998; Qiu et al., 1999; 刘华清 等, 2003)、菜豆(Vanhouten & MacKenzie, 1999)、小麦(Ma et al., 2000; Chen et al., 2002)、玉米(Zhang et al., 2000; Yang et al., 2003)、甘蓝(Vicente & King, 2001; Gao et al., 2004)、棉花(王省芬 等, 2006)、油菜(陈书元 等, 2008)等。BAC 文库在基因的染色体物理定位、物理图谱构建、比较基因组研究、基因的图位克隆、基因组测序等方面发挥着重要作用。

大白菜[*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson]是十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica*)植物, 是我国乃至世界重要的蔬菜作物。自 2003 年成立多国芸薹属基因组计划以来, 韩国和英国构建了白菜类作物 A 基因组的 BAC 文库(KBrH、KBrB、KBrS、JBr), 并利用 BAC 克隆末端测序进行了一系列结构基因组方面的研究(<http://www.brassica.info>; Bancroft, 2006)。Trick 等(2007)和 Suwabe 等(2008)利用 BAC 克隆末端测序进行了 A 基因组的序列分析及甘蓝型油菜与白菜基因组遗传连锁图谱的整合。Park 等(2005)和 Hong 等(2006)利用 BAC 克隆开展了大白菜与拟南芥的比较基因组研究。Mun 等(2008)建立了基于大白菜 BAC 克隆的第 1 张物理图谱。河北农业大学园艺学院蔬菜育种实验室多年来一直从事大白菜细胞、分子遗传及育种工作, 创建了大白菜整套初级三体以及结球甘蓝—大白菜异附加系等多种遗传材料(申书兴 等, 2006; 张玉成, 2008; 顾爱侠 等, 2009; 张巍巍 等, 2009)。由于大白菜和结球甘蓝均属于小染色体作物, 普通的核型分析方法很难将异附加系中结球甘蓝和大白菜的全部染色体分辨出来。本研究中以具有我国特色的优良大白菜自交系为材料构建 BAC 文库, 为利用 BAC-FISH 技术区分异附加系中外源染色体、定位和筛选优良的功能基因以及研究基因间互作与性状间的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为大白菜自交系‘85-1’, 是包头品种类型的骨干亲本。该自交系叶色浅绿、叶帮白, 叶球圆形, 生长期 70 d 左右, 抗病性强, 配合力高。由河北农业大学园艺学院蔬菜育种实验室提供。

1.2 主要试剂及仪器

克隆载体采用 Epicentre 公司的 pIndigoBAC-5(*Hind*III-cloning ready); 感受态细胞采用 Invitrogen 公司的 DH10B 菌株; *Hind*III 和 T4 连接酶购自 NEB 公司; 精胺、亚精胺、蛋白酶 K、氯霉素购自 Sigma 公司。脉冲场电泳仪采用 Bio-Rad CHEF-DR II, 电击转化仪采用 Bio-Rad Gene Pulser II, 冷冻离心机为 Sigma 公司的 3-16 PK。

1.3 BAC 文库构建方法

1.3.1 高分子量基因组 DNA 的提取

本提取方法按照 Zhang 等(1996)和 Ma 等(2000)方法并做改进。取培养 12~15 d 的大白菜真叶 30 g 用液氮浸泡研磨成粉末, 迅速放在 300 mL 预冷的核离析液中(内含 0.1% β -巯基乙醇 + 10% Triton-100), 15 min 后用微细滤布(Microcloth)过滤到 50 mL 离心管中, 4 °C 1 800 × g 离心 10 min, 加 5 mL 核离析液悬浮细胞核, 合并各离心管的溶液, 4 °C 1 800 × g 离心 10 min, 重复 1

次。加入不含 β -巯基乙醇和 Triton-100 的核离析液 1 mL。42 °C 水浴 3 min, 迅速加入等体积的 1.5% 低熔点琼脂糖 (核离析液配制), 轻轻混匀, 加入胶块模具 (Plug mold) 中, 冰上 30 min, 制备成胶块。将胶块放入含 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶 K 的裂解液中, 50 °C 水浴摇床中 22 h, 重复 1 次。将胶块置于 30 mL 含 $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的 $\text{T}_{10}\text{E}_{10}$ ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 中冰上 2 h, 重复 1 次。再将胶块放在不含 PMSF 的 $\text{T}_{10}\text{E}_{10}$ 中 1 h 清洗胶块, 重复 1 次。随后将胶块置于 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 中 4 °C 保存备用。

1.3.2 基因组 DNA 的部分酶切及大片段 DNA 的获得

选择最佳酶切条件之前, 首先对胶块进行预电泳, 预电泳条件为: 电压 $4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 起始脉冲 5 s, 终止脉冲 5 s, 脉冲时间 4 h。用不同酶量 [0.6 U、1.5 U、2.5 U、3.5 U、4.5 U、6.5 U (U 为酶活力单位: 1 个酶活力单位是在 1 min 内能转化 $1 \text{ } \mu\text{mol}$ 底物的酶量)] 的 *Hind*III 分别酶切半个胶块 30 min, 电泳检测最佳的酶切条件, 脉冲电泳条件为: 电压 $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 起始脉冲 50 s, 终止脉冲 50 s, 脉冲时间 16 h。选定最佳酶切条件后, 对 3 个胶块进行大量酶切, 酶切后采用 2 次脉冲电泳选择法获得目的片段。第 1 次选择 100 ~ 300 kb 之间的 DNA, 用刀片切割下来, 然后将此胶块分成两部分 (100 ~ 200 kb, 200 ~ 300 kb), 进行第 2 次电泳, 电泳后分别将 DNA 胶块切割下来, 通过电洗脱方法得到大片段 DNA, 在 TE 溶液中透析 2 h。以不同浓度的 λ DNA 为对照, 电泳估测大片段 DNA 的浓度。

1.3.3 大片段 DNA 与载体的连接转化

连接体系为: pIndigoBAC-5 载体 10 ng, 部分酶切的大片段 DNA 100 ng, $10 \times \text{buffer}$ 10 μL , 400 U T4 连接酶 1 μL , 加 ddH₂O 至 100 μL , 16 °C 连接过夜。连接产物经 TE 溶液中脱盐浓缩处理 3 h。取 10 μL 感受态细胞冰上备用, 加连接产物 2 μL , 进行电击转化。电击条件为: $V = 14 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\Omega = 200$, 电容 = 25 μF 。转化液加入 1 mL SOC 培养基中, 37 °C $225 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养箱中培养 1 h。在含有氯霉素 ($12.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 培养基上培养过夜。检测克隆的插入片段情况, 挑取覆盖基因组约 10 倍的克隆储存在含冻存液的 384 孔板中, -80 °C 保存。

1.4 BAC 文库的质量检测

挑取 200 个克隆, 经摇菌培养, 按照碱裂解法提取质粒, *Not* I 酶切检测插入片段的大小、空载率。随机挑取 6 个克隆, 继代培养 5 d, 分别取培养 1、3、5 d 的菌液提取质粒, 37 °C *Hind*III 完全酶切, 根据酶切的指纹图谱检测克隆的稳定性。

2 结果与分析

2.1 高分子量基因组 DNA 的质量检测

胶块经裂解及含 PMSF 的 TE 处理后, 脉冲场电泳检测胶块中 DNA 的质量。由图 1 可以看出,

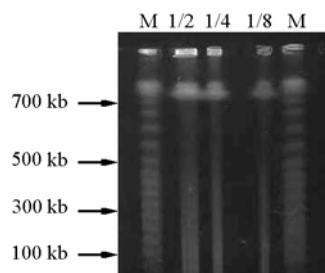


图 1 高分子量 DNA 的检测

Fig. 1 Determination of high molecular weight DNA

M: Marker.

1/2 胶块、1/4 胶块、1/8 胶块均含有亮带, 其 DNA 片段大小集中在 700 kb 以上, 且降解较少, 能够满足试验的要求。

2.2 最佳酶切条件的选择

对 DNA 进行部分酶切时受两方面的影响, 一是酶浓度, 二是酶切时间。本试验的酶切时间固定为 30 min, 主要对酶切浓度进行选择。由图 2 可以看出酶的用量在 1.5 U 和 2.5 U 时, 酶切片段集中在 100 ~ 300 kb 之间, 这正是需要的目的片段。随着酶用量的增高, 酶切片段越来越小, 当酶用量达到 6.5 U 时, 片段集中在 150 kb 以下, 不能满足试验需要。因此, 对 DNA 进行大量酶切时选用 1.5 ~ 2.5 U 的酶用量, 37 °C, 酶切 30 min。

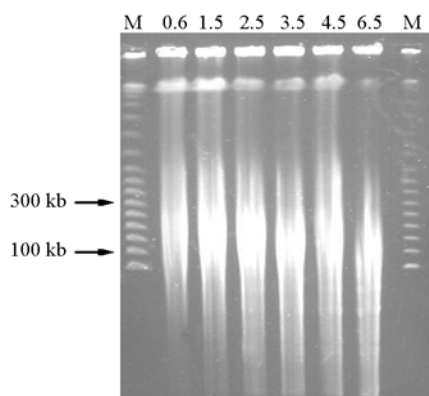


图 2 最佳酶切条件的确定

*Hind*III 酶用量单位: U。

Fig. 2 Determination of optimal partial digestion conditions

Unit of *Hind*III enzyme: U.

2.3 大片段 DNA 的获得

经过第 1 次选择, 切下 100 ~ 300 kb 的目的片段。将第 1 次切下的胶块横切分成 100 ~ 200 kb 和 200 ~ 300 kb 两个胶块, 继续电泳。电泳后的 DNA 很集中, 对回收有利。

用电洗脱的方法将 DNA 从第 2 次选择后切下的胶块中洗脱下来。经不同浓度的未酶切的 λ DNA 电泳检测, DNA 片段浓度为 4 ~ 6 ng · μ L⁻¹, 能够满足连接的需要。

2.4 DNA 与载体的连接转化

100 ~ 200 kb 和 200 ~ 300 kb DNA 与载体的连接均按照质量比 10 : 1 的比例连接 16 h。转化后经涂板培养得知, 100 ~ 200 kb 的 DNA 转化效率较高, 1 次转化 2 μ L 连接产物得到 5 000 个左右的克隆, 而 200 ~ 300 kb 的 DNA 1 次转化只能得到 800 个左右的克隆, 这说明片段越大连接转化的效率越低。本文库的构建采用 100 ~ 200 kb 的片段做连接, 共做 13 次转化, 挑取 57 600 个克隆, 冻存在 384 孔板中。

2.5 BAC 文库质量的检测

2.5.1 插入片段及空载率的检测

随机挑取 200 个克隆, 用碱裂解法提取质粒 DNA, *Not* I 酶切后检测插入片段的大小及空载率 (图 3), 并统计各长度片段的分布情况 (图 4)。经统计, 200 个克隆中插入片段多集中在 90 ~ 120 kb 之间, 85% 的 BAC 插入片段在 90 kb 以上, 片段大小的均一性较好, 平均插入片段大小为 98.4 kb。200 个克

隆中有3个无插入片段，空载率为1.5%。如果以大白菜单倍体基因组总长度550 Mb (Johnston et al., 2005) 计算，本文库重组子的覆盖率达到大白菜基因组的10.3倍。

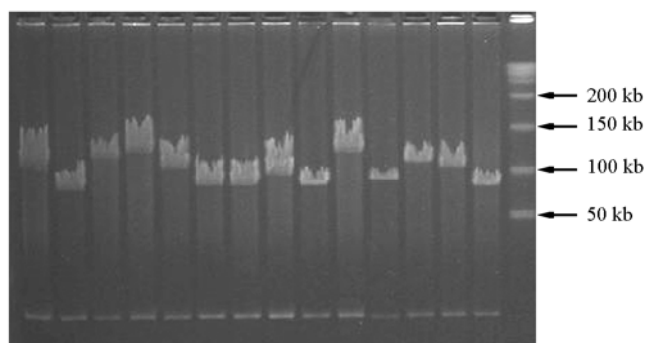


图 3 BAC克隆插入片段大小检测

Fig. 3 Evaluation of insert size of BAC clones

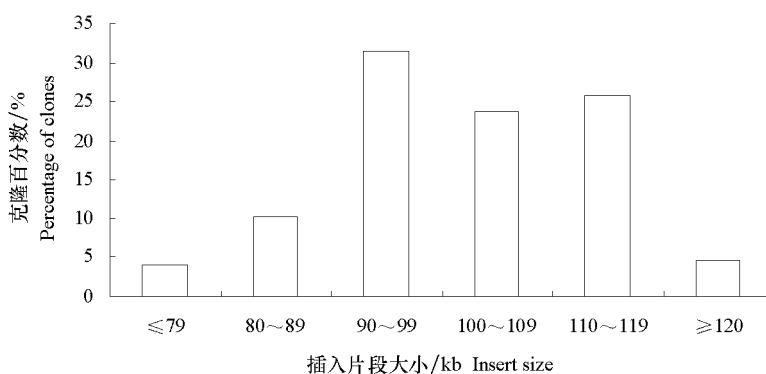


图 4 BAC文库中插入片段的分布

Fig. 4 Distribution of BAC clones insert sizes

2.5.2 BAC克隆的稳定性检测

随机挑取 6 个 BAC 克隆进行培养，然后将培养 1 d (约 25 代)、3 d (约 75 代)、5 d (约 125 代) 的菌液分别提取质粒进行 *Hind* III 完全酶切和电泳检测。结果表明，各个克隆经过约 125 代左右的繁殖，DNA 指纹图谱没有变化 (图 5)，这证明 DNA 插入片段能够在大肠杆菌中稳定遗传，克隆的稳定性较好。

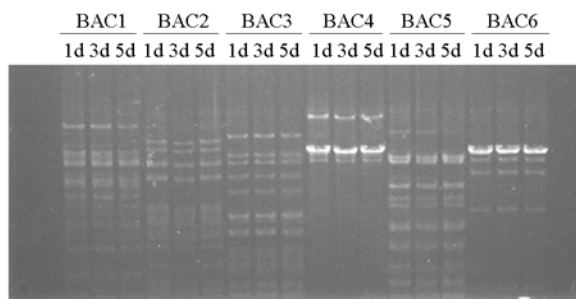


图 5 BAC 克隆的稳定性检测

Fig. 5 Stability analysis of BAC clones

3 讨论

BAC 文库构建中, DNA 提取的质量好坏是连接转化的关键之一 (Kim et al., 1996)。提取 DNA 的质量主要是指包埋胶块中 DNA 的纯度、浓度及片段大小。胶块中 DNA 的纯度与 DNA 提取过程中材料的选取关系很大, 一般采用幼嫩的真叶, 也有用子叶成功的报道 (王省芬 等, 2006)。本试验曾采用幼嫩的子叶为材料提取 DNA, 胶块的颜色较白, 经酶切的 DNA 用于连接转化时, 转化率很低, 只有几个克隆。可能是由于幼苗培养时间短, 子叶中含有较多的淀粉和蛋白质等营养物质, 造成 DNA 纯度不高, 影响了酶切效果, 最终造成连接转化失败。幼嫩的真叶细胞含有的营养物质较少, 对获得纯度高的 DNA 有利。提取的 DNA 片段大小达到 700 kb 以上时, 才能经部分酶切、电泳、洗脱等系列过程后获得足够大小的目的 DNA 片段, 若在提取过程中降解太多, 使得胶块中的 DNA 片段太小, 浓度也降低, 就不能满足后续试验过程的需要。洗脱后用于连接的 DNA 浓度太低 ($<2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 往往造成连接的失败。

DNA 部分酶切主要受酶浓度和酶切时间的影响, 因此, 控制部分酶切主要有两种方式, 一是酶浓度固定, 酶切时间不同, 二是酶切时间固定, 调节酶浓度, 多数研究采用第 2 种酶切方式。王省芬等 (2006) 研究棉花 BAC 文库构建时, 在 200 μL 反应体系中酶切半个胶块, 酶切时间固定在 30 min, 酶用量在 3 ~ 4 U 之间酶切效果最好, 而本研究在同样的酶切体系中用同样的酶切时间, 酶用量在 1.5 ~ 2.5 U 之间酶切效果最好。因此, 不同植物材料酶切时间相同时, 酶浓度却有所不同。

部分酶切后的 DNA 常采用 2 次电泳选择法获得目的大片段。研究证实, DNA 电泳后, 割取的 DNA 经回收用于连接转化后, 往往获得很多小于目的 DNA 的插入片段。Huo 等 (2006) 割取 150 ~ 350 kb 的 DNA 获得的插入片段在 30 ~ 200 kb 之间, 陈书元等 (2008) 割取 100 ~ 350 kb 的 DNA 获得的插入片段在 50 ~ 300 kb 之间。可见, 割取的 100 ~ 200 kb 的 DNA 中往往混杂有 100 kb 以下的片段, 200 ~ 300 kb 的 DNA 中含有 200 kb 以下的片段。酶切后的 DNA 经过多次电泳选择去除小片段的效果比 1 次选择好, 电泳次数越多, 割取的 DNA 片段长度一致性越好, 但选择次数越多丢失的 DNA 也越多, 因此, 多选用 2 次电泳选择法获得大片段 DNA。

BAC 文库构建除了要求获得高质量的 DNA 外, 还需要高的连接转化效率, 连接效率与插入片段的大小密切相关, 插入片段越大, 连接效率越低。本试验将割取的 200 ~ 300 kb 的 DNA 与载体连接转化, 插入片段大小平均为 120 kb 左右, 尽管插入片段比 100 ~ 200 kb DNA 增大, 但 1 次转化获得的阳性克隆 (约 800 个) 只有 100 ~ 200 kb 片段获得克隆数的 16% 左右, 要得到足够多的克隆, 需做的转化次数增加, 成本也就大大提高。而在 BAC 文库的应用中, 90 kb 以上的插入片段即可满足试验的要求, 因此, 本试验采用 100 ~ 200 kb 的片段进行连接转化构建了大白菜 BAC 文库。

References

- Bancroft I. 2006. The multinational *Brassica* genome project. *Acta Horticulturae*, 706: 65 - 66.
- Chen F G, Zhang X Y, Xia G M, Jia J Z. 2002. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for *Triticum boeoticum*. *Acta Botanica Sinica*, 44: 451 - 456.
- Chen Shu-yuan, Chao Jin-quan, Xu You-ming, Wang Tai-xia, Yan Xiao-hong, Wang Li-jun, Hu Qiong, Wei Wen-hui. 2008. Construction of the BAC library of *Brassica napus* - Chinese Xinjiang wild rape (*Sinapis arvensis*) disomic alien addition line. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 30 (2): 137 - 142. (in Chinese)
- 陈书元, 晁金泉, 徐有明, 王太霞, 闫晓红, 王力军, 胡 琼, 魏文辉. 2008. 甘蓝型油菜—新疆野生油菜二体异附加系BAC文库的构建. *中国油料作物学报*, 30 (2): 137 - 142.
- Choi S, Creelman R A, Mullet J E, Wing R A. 1995. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis*

- thaliana*. Plant Molecular Biology Reporter, 13: 124 – 128.
- Gao M, Li G, Yang B, McCombie W R, Quiros C F. 2004. Comparative analysis of a *Brassica* BAC clone containing several major aliphatic glucosinolate genes with its corresponding *Arabidopsis* sequence. Genome, 47: 666 – 679.
- Gu Ai-xia, Zheng Bao-zhi, Wang Yan-hua, Xuan Shu-xin, Luo Shuang-xia, Shen Shu-xing. 2009. Obtaining and studies of Chinese cabbage monosomic alien addition line with chromosome 3 of cabbage. Acta Horticulturae Sinica, 36 (1): 39 – 44. (in Chinese)
- 顾爱侠, 郑宝智, 王彦华, 轩淑欣, 罗双霞, 申书兴. 2009. 附加甘蓝3号染色体的大白菜单体异附加系的获得. 园艺学报, 36 (1): 39 – 44.
- Hong C P, Plaha P, Koo D H, Yang T J, Choi S R, Lee Y K, Uhm T, Bang J W, Edwards D, Bancroft I, Park B S, Lee J, Lim Y P. 2006. A survey of the *Brassica rapa* genome through BAC-end sequence analysis, and comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. Molecules and Cells, 22: 300 – 307.
- Huo N, Gu Y Q, Lazo G R, Vogel J P, Coleman Derr D, Luo M C, Thilmony R, Garvin D F, Anderson O D. 2006. Construction and characterization of two BAC libraries from *Brachypodium distachyon*, a new model for grass genomics. Genome, 49 (9): 1099 – 1108.
- Johnston J S, Pepper A E, Hall A E, Chen Z J, Hodnett G, Drabek J, Lopez R, Price H J. 2005. Evolution of genome size in Brassicaceae. Annals of Botany, 95 (1): 229 – 235.
- Kim U J, Birren B W, Slepak T, Mancino V, Boysen C, Kang H L, Simon M I, Shizuya H. 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. Genomics, 34: 213 – 218.
- Liu Hua-qing, Zhou Li-jun, Duan Yuan-lin, Huang Dai-qing, Wu Wei-ren, Xue Yong-biao. 2003. Construction of a genomic DNA library of an indica rice variety H359 based on transformation-competent artificial chromosomes. Molecular Plant Breeding, 1 (1): 27 – 32. (in Chinese)
- 刘华清, 周丽君, 段远霖, 黄代青, 吴为人, 薛勇彪. 2003. 籼稻品种H359基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库的构建. 分子植物育种, 1 (1): 27 – 32.
- Ma Z Y, Song W, Peter J S, Liu C J. 2000. Non-gridded library: A new approach for BAC (bacterial artificial chromosome) exploitation in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). Nucleic Acids Research, 28 (24): e106.
- Mun J H, Kwon S J, Yang T J, Kim H S, Choi B S, Baek S, Kim J S, Jin M, Kim J A, Lim M H, Lee S I, Kim H I, Kim H, Lim Y P, Park B S. 2008. The first generation of a BAC-based physical map of *Brassica rapa*. Genomics, 9: 280.
- Park J Y, Koo D H, Hong C P, Lee S J, Jeon J W, Lee S H, Yun P Y, Park B S, Kim H R, Bang J W, Plaha P, Bancroft I, Lim Y P. 2005. Physical mapping and microsynteny of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* genome corresponding to a 222 kb gene-rich region of *Arabidopsis* chromosome 4 and partially duplicated on chromosome 5. Molecular Genetics and Genomics, 274 (6): 579 – 588.
- Peng Kai-man, Zhang Hong-bin, Zhang Qi-fa. 1998. A BAC library constructed to the rice cultivar “MingHui 63” for cloning genes of agronomic importance. Acta Botanica Sinica, 40 (12): 1108 – 1114. (in Chinese)
- 彭开蔓, 张洪斌, 张启发. 1998. 优良水稻品种明恢63BAC文库的构建. 植物学报, 40 (12): 1108 – 1114.
- Qiu F, Jin D M, Fu J M, Zhang C L, Xie W W, Yang R C, Zhang H B, Wang B. 1999. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of thermo-sensitive genie male-sterile rice 5460S. Science in China: Series C: Life Sciences, 29 (5): 515 – 524.
- 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.
- Suwabe K, Morgan C, Bancroft I. 2008. Integration of *Brassica* a genome genetic linkage map between *Brassica napus* and *B. rapa*. Genome, 51: 169 – 176.
- Trick M, Bancroft I, Lim Y P. 2007. The *Brassica rapa* genome sequencing initiative. Genes, Genomes and Genomics, 1: 35 – 39.
- Vanhouten W, MacKenzie S. 1999. Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. Plant Molecular Biology, 40: 977 – 983.
- Vicente J G, King G J. 2001. Characterization of disease resistance gene-like sequences in *Brassica oleracea* L. Theoretical and Applied Genetics,

102: 555 - 563.

Wang Xing-fen, Ma Jun, Ma Zhi-ying, Zhang Gui-yin, Zheng Yong-min. 2006. BAC library construction and characterization of suyuan 7235, a cotton germplasm with high fiber strength. *Cotton Science*, 18 (4): 200 - 203. (in Chinese)

王省芬, 马 骏, 马峙英, 张桂寅, 郑拥民. 2006. 高纤维强力棉花种质系苏远7235BAC文库的构建. *棉花学报*, 18 (4): 200 - 203.

Yang J L, Wang Q H, Deng D Y, Weng M L, Yin X Y, Jin D M, Zhang J R, Wang B. 2003. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of maize inbred line 77Ht2. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21 (2): 159 - 169.

Zhang F D, Zheng Y L, Cao Z G. 2000. Construction of a bacterial artificial chromosome library of S-type CMS maize mitochondria. *Chinese Science Bulletin*, 45 (18): 1692 - 1697.

Zhang H B, Zhao X, Ding X, Paterson A H, Wing R A. 1996. Preparation of megabase-sized DNA from plant nuclei. *Plant Journal*, 7: 175 - 184.

Zhang Wei-wei, Shen Shu-xing, Wang Yan-hua, Chen Xue-ping, Xuan Shu-xin, Luo Shuang-xia, Li Xiao-feng. 2009. Studies on isolated microspore culture of the allotriploid hybrids between cabbage and Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (4): 583 - 586. (in Chinese)

张巍巍, 申书兴, 王彦华, 陈雪萍, 轩淑欣, 罗双霞, 李晓峰. 2009. 结球甘蓝一大白菜异源三倍体小孢子培养的研究. *园艺学报*, 36 (4): 583 - 586.

Zhang Yu-cheng. 2008. Creation of several cabbage - Chinese cabbage monosomic alien addition lines[M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)

张玉成. 2008. 结球甘蓝一大白菜部分单体异附加系的创建[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.

图书推荐

《新编拉汉英植物名称》 王宗训主编

本书收集具有经济价值和学术价值或通俗常见的种子植物、蕨类植物、苔藓植物、藻类植物、真菌、地衣名称 55 800 条。每种植物名称有拉、汉、英三种文字对照, 按拉丁文字母顺序排列。书后附有英文俗名和汉名索引。

本书可供农、林、医药、环境保护等学科的管理机构、科研单位、大学中的科技人员以及生物工程、植物检疫、花卉园艺、新闻出版、旅游、外贸等专业的技术人员使用, 也是各类图书馆典藏的重要工具书。定价: 185 元(含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。