

研究报告

Research Report

油菜 Pol-CMS *Rfp* 候选基因区域 SSR 标记开发与应用

王同华 李宝 郭一鸣 张瑶婷 刘新红 范连益 曲亮 邓力超 李莓*

湖南省作物研究所, 湖南省杂交油菜工程技术研究中心, 长沙, 410125

* 通信作者, Limei1230@126.com

摘要 波里马细胞质雄性不育系(Pol-CMS)的育性受环境温度影响较大,在杂交制种过程中易自交结实产生假杂种,从而影响杂交种的纯度质量,在生产上对母本假杂种的检测是杂交种纯度鉴定的关键。本研究利用已公布的 Pol-CMS 候选恢复基因 *Rfp* 编码序列,通过在白菜型油菜和甘蓝型油菜基因组进行同源序列比对,然后基于 *Rfp* 候选基因区域同源序列开发恢复基因的特异 SSR 标记,并应用于油菜杂交种纯度鉴定研究。研究表明,利用已公布 Pol-CMS 恢复基因 1 953 bp 编码序列获取 *Rfp* 在基因组所在区段,在该区域及上、下游 15K 区域共获得 32 个 SSR 位点;其中,1 个位点在供试的 Pol-CMS 不育系和恢复系间具有多态性,该标记为共显性标记,在不育系中的扩增产物大小为 162 bp,在恢复系中为 184 bp;与不育系相比,恢复系的扩增序列存在一个 15 bp 和一个 7 bp 的片段插入;在‘沔油 737’的 F₂ 分离群体中,该标记与育性恢复性状呈共分离遗传;利用该标记对‘沔油 737’、‘沔油 320’和‘沔油 958’杂交制种样品的纯度鉴定结果与田间育性鉴定结果一致,表明本研究开发的 SSR 标记为 *Rfp* 基因紧密连锁的共显性标记,在 Pol-CMS 杂交品种的纯度鉴定应用中,可有效检测出混杂的父母本假杂种。本研究结果可为油菜杂交品种纯度鉴定与遗传多样性分析提供技术参考。

关键词 油菜(*Brassica napus* L.); Pol-CMS; 恢复基因; SSR

Development of SSR Markers Associated with Polima CMS Fertility Restorer in *Brassica napus* L. and Its Application

Wang Tonghua Li Bao Guo Yiming Zhang Yaoting Liu Xinhong Fan Lianyi Quliang Deng Lichao Li Mei*

Hunan Hybrid Rape Engineering Technology Research Center, Crop Research Institute of Hunan Province, Changsha, 410125

* Corresponding author, Limei1230@126.com

DOI: 10.13271/j.mpb.020.001206

Abstract The Polima system of cytoplasmic male sterility (Pol-CMS) is widely used for hybrid seed production, but with high probability of occurrence of maternal false hybrid due to the fertility of Polima CMS (Pol-CMS) line is greatly affected by the ambient temperature, therefore, the detection of maternal false hybrids is the key to purity identification. The present study, the SSR markers were designed based on the flanking sequences of Pol-CMS restorer gene *Rfp*, and application of SSR markers in hybrid seed purity test of rapeseed. The main results were as follows: the sequences of *Rfp* were subjected to basic local alignment search tool queries against the *Brassica napus* genome to determine chromosome positions, and 32 SSR markers were developed based the upstream and downstream sequences of *Rfp*. Among the 32 SSR markers, one codominant marker was polymorphic between Pol-CMS sterile line and Pol-CMS restorer line, the PCR product length was 162 bp in Pol-CMS sterile lines, and

基金项目: 本研究由湖南省农业科学院科技创新项目(2019YC02)和国家油菜产业技术体系项目(CARS-12)共同资助

引用格式: Wang T.H., Li B., Guo Y.M., Zhang Y.T., Liu X.H., Fan L.Y., Qu L., Deng L.C., and Li M., 2022, Development of SSR markers associated with polima CMS fertility restorer in *Brassica napus* L. and its application, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 20(4): 1206-1213. (王同华, 李宝, 郭一鸣, 张瑶婷, 刘新红, 范连益, 曲亮, 邓力超, 李莓, 2022, 油菜 Pol-CMS *Rfp* 候选基因区域 SSR 标记开发与应用, 分子植物育种, 20(4): 1206-1213.)

184 bp in restorer lines. Based on the PCR sequence, two insert fragments (15 bp and 7 bp) were identified in Pol-CMS restorer lines. The SSR marker co-segregated with plant fertility of individuals in the 'Fengyou737' F₂ population. The purity of 'Fengyou737', 'Fengyou320' and 'Fengyou958' were identified by means of PCR-SSR markers and field-planting, and the results of two ways were highly consistent, indicated that the codominant SSR marker tightly linked to *Rfp*, and the marker can detect paternal and maternal false hybrids. The present findings will provide technical assistance for hybrid seed purity test and genetic diversity analysis in rapeseed.

Keywords *Brassica napus* L.; Pol CMS; Restorer gene; SSR

波里马细胞质不育(polima cytoplasmic male sterility, Pol-CMS)是第一个具有生产价值的甘蓝型油菜细胞质雄性不育类型,也是目前中国油菜应用范围最广的杂交种授粉控制系统的不育源(傅廷栋, 1995)。该系统不育系的不育性受位于线粒体不育基因与核基因组互作控制,其育性恢复基因(*Rfp*)位于核基因组(Yang et al., 1996)。该类型不育系的育性容易受环境温度影响,在大面积杂交制种过程易出现微粉自交结实现象,导致产生母本假杂种。由于母本假杂种为不育株,不仅影响品种的一致性,还严重影响了品种产量优势的发挥。因此,在油菜杂交种应用生产之前必须进行严格的种子纯度质量鉴定(Jean et al., 1997; Natasa et al., 2006; 2010; Zhao et al., 2010)。目前,油菜纯度质量室内鉴定主要用同工酶电泳、醇溶蛋白电泳和分子标记技术三大类。其中,同工酶电泳和醇溶蛋白电泳具有技术简便、鉴定快速、所需成本低廉等优点,但同工酶和贮藏蛋白多态性相对较低,对于某些杂交组合难以将其亲本与杂交种区分开,该技术的实际应用受到了极大限制。基于基因组 DNA 序列的分子标记,特别是 90 年代初期发展起来的 SSR 标记(王西成等, 2010; 张宏磊等, 2013a; 2013b),其数量极为丰富,多态性高,且相对其他分子标记而言该类型标记操作技术相对简单、成本较低,已成为人们在作物品种纯度和真伪鉴定方面首选的分子标记类型(贺道华等, 2009; 宋晓贺等, 2013; 王昊龙等, 2014; 朱国忠等, 2015; 王盼乔等, 2016)。但随着育种资源遗传多样性日趋狭窄,SSR 标记筛选工作量已越来越大。同时,育种家在杂交种亲本选育时,往往在表型性状基本一致时,便开始亲本繁殖和杂交制种,而在分子层面上遗传信息仍存在分离现象,导致杂交种纯度鉴定的准确性难以保证(王永霞等, 2009; 战宗祥等, 2015; 李海渤, 2016)。

控制油菜 Pol-CMS 育性恢复的是单显基因 *Rfp* (Yang et al., 1996)。近年来,学者们对该基因做了大量的遗传定位工作,并开发了一系列与育性恢复基

因连锁的分子标记(刘平武等, 2007; 杨景华等, 2008), *Rfp* 基因曾先后分别被定为位于 N₉ 或 N₁₈ 连锁群上。直到 2014 年, *Rfp* 被定位在甘蓝型油菜的 N₉ 连锁群,并通过分子标记分析将 *Rfp* 基因限定在白菜型油菜基因组 A₉ 上 29.2 k 的区域。该区域含有 7 个 ORFs,其中 *ORF2* 很有可能与育性恢复有关(Liu et al., 2012; 刘智, 2012)。后来,该学者将 *ORF2* 在甘蓝型油菜不育系进行遗传转化。结果表明, *ORF2* 具有育性恢复的功能(Chen et al., 2014),进一步序列分析的结果表明, *ORF2* 的编码区长 1 953 bp (刘国圣和张大乐, 2016)。同时,白菜和甘蓝型油菜基因组测序信息分别于 2011 年和 2014 年完成数据库公布,也为分子标记开发提供了可利用的参考平台。

本研究针对目前 Pol-CMS 杂交种纯度鉴定的实际需求,利用 *Rfp* 候选基因区域序列信息,在甘蓝型油菜和白菜基因组进行目标序列 BLAST 分析,确定与育性恢复相关 *PPR* 基因的位置及序列,然后在其附近区域开发 SSR 标记,并用于 Pol-CMS 杂交品种的纯度鉴定研究,以期为油菜杂交种纯度鉴定工作提供更为准确、高效的检测方法。

1 结果与分析

1.1 育性恢复基因连锁 SSR 标记开发

利用刘国圣和张大乐(2016)公布的 *ORF2* 的 1 953 bp 序列在白菜型油菜 A₉ 染色体获得一个高度同源区域(同源性 99%),并在该区域上、下游 15 k 区域内共获得 32 个 SSR 位点,在线设计合成了 32 对 SSR 引物。利用该 32 对引物对 10 份供试亲本材料基因组 DNA 进行 PCR 扩增,筛选获得 1 对 SSR 引物 RfpSSR19 (F: AGTTAGCTCCTCTGTGGTTTGC, R: CTACAGCTCGATTAGGGATCGT),其扩增位点位于甘蓝型油菜基因组的 NC_024 803.1: 34 437 588~34 437 748 处,在供试的 4 个不育系和 6 个恢复系间具有明显的多态性(图 1),为不育系和恢复系的共显性标记。特异片段的测序结果表明,不育系中扩增

片段大小为 162 bp, 恢复系中扩增片段大小为 184 bp; 与不育系相比, 恢复系扩增片段中存在 15 和 7 bp 的插入(图2)。将 RfpSSR19 扩增产物在甘蓝型油菜中进行比对发现, 该标记位于 *Rfp* 翻译起始位点上游的 -3 962~-3 801 bp 区段, 这表明本研究获得的标记 RfpSSR19 与 *Rfp* 基因紧密连锁。

1.2 F₂ 分离群体单株田间定位试验

盛花期, 对 Pol-CMS 杂交品种‘沱油 737’自交后代 F₂ 分离群体于进行育性考查, 同时采用 SSR 标记 RfpSSR19 对随机选择的 192 个单株进行基因型

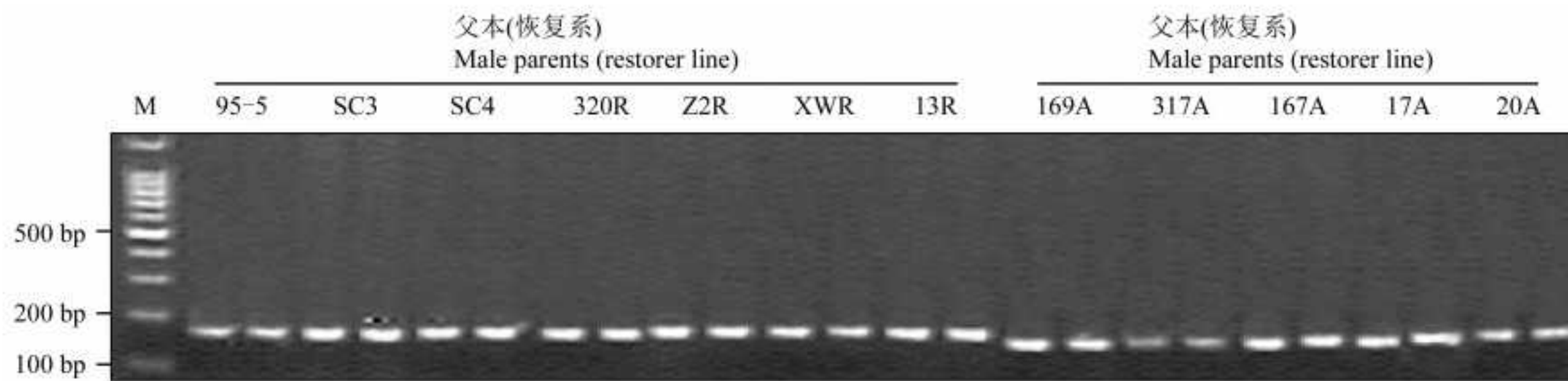


图 1 引物 RfpSSR19 在 12 个供试亲本间的 PCR 扩增

注: M: 100 bp DNA Ladder

Figure 1 Banding patterns of the 12 parents of hybrids amplified by RfpSSR19

Note: M: 100 bp DNA Ladder

```

17A TAGTTAGCTCCTCTGTGGTTTGCCCGGTGCTCAAGAAACGATCTATTCTTTTTT-----CTCGTCTTCGTTTCGTCAGTTCGAGCTTCTTC
20A TAGTTAGCTCCTCTGTGGTTTGCCCGGTGCTCAAGAAACGATCTATTCTTTTTT-----CTCGTCTTCGTTTCGTCAGTTCGAGCTTCTTC
SC3 TAGTTAGCTCCTCTGTGGTTTGCCCGGTGCTCAAGAAACGATCTATTCTTTTTTCTTTCTCGTCTTCGTTTCGTCAGTTCGAGCTTCTTC
SC4 TAGTTAGCTCCTCTGTGGTTTGCCCGGTGCTCAAGAAACGATCTATTCTTTTTTCTTTCTCGTCTTCGTTTCGTCAGTTCGAGCTTCTTC

17A ATCTTCTTCTTCTTCTCGCTT-----CAATTGATTACTTTTTCTTCGTCAGGATGTTTACGATCCCTAATCGAGCTGTAG
20A ATCTTCTTCTTCTTCTCGCTT-----CAATTGATTACTTTTTCTTCGTCAGGATGTTTACGATCCCTAATCGAGCTGTAG
SC3 ATCTTCTTCTTCTTCTCGCTTAACCCCTATTCTCTCAATTGATTACTTTTTCTTCGTCAGGATGTTTACGATCCCTAATCGAGCTGTAG
SC4 ATCTTCTTCTTCTTCTCGCTTAACCCCTATTCTCTCAATTGATTACTTTTTCTTCGTCAGGATGTTTACGATCCCTAATCGAGCTGTAG
    
```

图 2 引物 RfpSSR19 在 2 个 Pol-CMS 不育系和 2 个恢复系中 PCR 扩增产物序列比对

Figure 2 Sequences comparison amplified by primers RfpSSR19 between two Pol-CMS lines and two restore lines

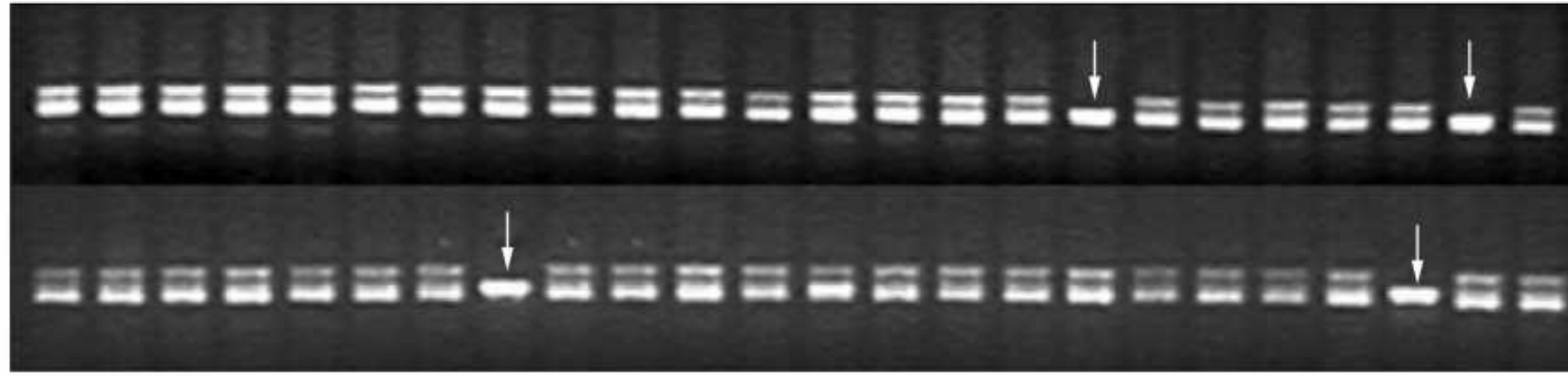


图4 供试品种‘沔油 737’杂交种样品基因组 DNA 的 SSR-PCR 扩增

注: 箭头: 母本假杂种

Figure 4 Amplification patterns of SSR-PCR in 'Fengyou737' hybrids purity identification

Note: Arrows: Female parent false hybrid

纯度结果中发现(表 1), 利用获得的 SSR 标记鉴定和田间种植鉴定的结果高度一致, 9 个供试样品的鉴定结果差异在 4% 以内, 说明标记 RpfSSR19 对本研究采用的供试材料中进行纯度鉴定结果是可靠的。

2 讨论

油菜 Pol-CMS 杂交制种系统存在不育系温度敏感问题, 长期以来种子纯度质量监控, 特别是杂交种中母本假杂种的准确鉴定, 一直是油菜杂交种生产不可或缺的环节(Zeng et al., 2009)。本研究基于油菜 Pol-CMS 杂交种纯度鉴定实际需求, 开发出与 *Rfp* 基因紧密连锁的特异 SSR 标记, 经过生产应用的检验表明, 该标记可用于不同 Pol-CMS 杂交品种的纯度质量鉴定, 且鉴定结果与田间育性鉴定高度一致。本研究解决了目前油菜杂交种纯度 SSR 鉴定标记需要针对杂交组合的父、母本从全基因组数据库筛选的问题(梅德圣等, 2006; 唐容等, 2007)。因此, 减少了前期大量的标记引物序列合成与筛选工作, 降低了鉴定的成本和前期投入, 有利于技术的普及和应用。同

时克服了普通 SSR 标记只能用于特定油菜杂交组合的样品种父本和母本基因型的检测, 受生物学和机械混杂假杂种影响程度大, 导致鉴定结果与田间育性鉴定往往会存在一定偏差的技术困难。

目前, 基于 PCR 扩增的分子标记技术, 特别是 SSR 标记技术由于数量多、多态性高、结果稳定、操作简便, 且遗传信息含量非常丰富(刘福青和李构, 2007; 陈怀琼等, 2009), 已成为油菜杂交种室内纯度鉴定的首选方法。本研究基于普通 SSR 标记的优点, 开发出位于 *Rfp* 基因翻译起始位点上游的 -3 962~-3 801 bp 区段的特异 SSR 标记, 由于与恢复基因间难以发生重组, 在理论上利用该标记可判断波里马细胞质雄性不育杂交种后代单株的育性。因此, 利用其进行纯度鉴定的结果与田间种植鉴定的单株育性表现更一致, 在杂交种纯度鉴定中更具实际意义; 同时, 该标记为共显性标记, 可有效判断杂交种样品中父本、母本假杂种类型, 可用于 Pol-CMS 亲本繁殖混杂种子的判定。本研究获得的研究结果可为种子管理和执法部门提供一个新的技术和方法。

表 1 供试品种杂交种样品田间种植鉴定和 SSR 标记鉴定的纯度

Table 1 Purity of field planting identification and SSR identification of hybrid samples

品种	样品编号	SSR 鉴定纯度(%)	田间种植鉴定纯度(%)
Cultivars	Samples No.	SSR purity (%)	Field purity (%)
沔油 737	737-1	89.5	91.6
Fengyou737	737-2	92.3	91.5
	737-3	87.9	90.2
	737-3	87.9	90.2
沔油 320	320-1	89.3	92.2
Fengyou320	320-2	88.8	89.1
	320-3	87.9	90.8
	320-3	87.9	90.8
沔油 958	958-1	92.1	90.5
Fengyou958	958-2	90.3	93.6
	958-3	88.5	91.7
	958-3	88.5	91.7

对于本研究供试的 9 个样品的分子标记鉴定纯度总体低于田间种植纯度,但相差在 4%以内,推测可能是由于在田间种植鉴定过程中,由于杂种具有更强的生长竞争优势,较亲本更容易存活成株,导致花期根据育性鉴定的结果偏高。此外,本研究获得的标记在不育系和恢复系间的多态性仅存在 22 bp 的差异,利用琼脂糖凝胶电泳分离所需要时间较长,可进一步引物设计开发出片段大小差异更明显的标记,以提高纯度鉴定的工作效率。

12 份,其中不育系 5 份,Pol-CMS 恢复系 7 份(表 2); Pol-CMS 杂交品种 ‘沔油 737’、‘沔油 320’、‘沔油 958’杂交 ‘沔油

3 材料与方法

3.1 试验材料

供试材料:甘蓝型油菜 Pol-CMS 杂交品种亲本

737’自交 F₂ 群体

表 2 12 份供试油菜亲本的名称及来源

Table 2 Name and source of 12 rapeseed lines tested in this study

编号	材料名称	来源
No.	Material name	Source
1	20A	江西资源转育 Pol-CMS 不育系 Pol-CMS sterile line transformed with germplasm from Jiangxi
2	317A	16A 与双低品系 317 双向正反交系选 Pol-CMS 不育系 Pol-CMS sterile line bred from reciprocal cross population between 16A and double-low line 317
3	167A	17A 不育系改良系选 Pol-CMS 不育系 Pol-CMS sterile line bred from 17A
4	17A	‘湘 5A’与‘中双 10 号’杂交系选 Pol-CMS 不育系 Pol-CMS sterile line bred from 'Xiang5A' with Pol-CMS and double-low line 'Zhongshuang10' by hybridization and subsequent orientation selection
5	169A	‘湘 5A’与 SC4 杂交系选 Pol-CMS 不育系 Pol-CMS sterile line bred from 'Xiang5A' with Pol-CMS and double-low line SC4 by hybridization and subsequent orientation selection
6	13R	‘湘油 13’转育 Pol-CMS 恢复系 Pol-CMS restorer line transformed with 'Xiangyou13'
7	XWR	湖北杂交组合自交系选 Pol-CMS 恢复系 Pol-CMS restorer line bred from Pol-CMS hybrid in Hubei
8	Z2R	‘中油杂 2 号’自交系选 Pol-CMS 恢复系 Pol-CMS restorer line bred from Pol-CMS hybrid 'Zhongyouza2'
9	320R	‘丰油 730’与品系 320 回交系选 Pol-CMS 恢复系 Pol-CMS restorer line bred from 'Fengyou730' with Pol-CMS and double-low line 320 by emasculation hybridization and subsequent orientation selection
10	SC4	四川资源转育 Pol-CMS 恢复系 Pol-CMS restorer line transformed with germplasms from Sichuan
11	SC3	四川资源转育 Pol-CMS 恢复系 Pol-CMS restorer line transformed with germplasms from Sichuan
12	95-5	湖北杂交组合自交系选 Pol-CMS 恢复系 Pol-CMS restorer line bred from Pol-CMS hybrids in Hubei

种子,播种于湖南省作物研究所试验场,每待测样品鉴定小区 8 行,行长 2.0 m,行距 0.5 m,均匀播种,全生育期不间苗。

3.3 育性恢复基因连锁 SSR 标记开发

刘国圣和张大乐(2016)公布的 ORF2 的 1 953 bp 序列,分别在白菜型油菜基因组和甘蓝型油菜基因组上(<http://brassicadb.org/brad/>)进行 BLAST 分析,确定与育性恢复相关的 *Rfp* 基因高度同源的物理位置;并基于该位置及其两侧 5、10、15k 区域寻找 SSR 位点,通过(<http://wsmartins.net/websat/>)在线设计 SSR 引物;然后,利用设计的 SSR 引物在不同恢复系、不育系基因组 DNA 上进行 PCR 扩增,筛选具有差异的引物作为 *Rfp* 基因的连锁标记。

3.4 育性分离群体共分离验证

在 7~9 叶期,依次顺序选取‘沔油 737’自交 F₂ 群体小区的 192 个单株进行吊牌编号,并提取取吊牌单株基因组 DNA,利用上述筛选到的引物进行 PCR 扩增,扩增产物经 3.0%的琼脂糖凝胶进行电泳分离,最后在凝胶成像系统中观察拍照、读带,记录各个单株的扩增带型。盛花期,调查供试的 192 个吊牌编号的单株育性表现。

3.5 杂交种样品的分子标记纯度鉴定

将供试 3 个品种的待检测样品发芽后,参照陈颖 CTAB 法提取幼胚基因组 DNA (陈颖, 1993, 世界林业研究, 6(2): 89-91)。利用获得的在不育系和恢复系间 PCR 扩增产物具有差异的引物,对‘沔油 737’、‘沔油 320’、‘沔油 958’制种样品幼胚基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物经 3.0%的琼脂糖凝胶进行电泳分离,最后在凝胶成像系统中观察拍照、读带,计算样品纯度。SSR 纯度(%)=(检测株数 - 母本带型数 - 父本带型数)×100/检测株数。

3.6 杂交种样品的田间种植纯度鉴定

将 3 个供试品种的待检测样品播种于湖南省作物研究所试验场,每待测样品鉴定小区 8 行,行长 2.0 m,行距 0.5 m,均匀播种,全生育期不间苗,盛花期根据育性调查各鉴定小区的样品纯度。田间鉴定纯度(%)=(检测株数 - 不育株数 - 异型株数)×100/检测株数。

作者贡献

王同华是本研究的实验设计者和实验研究的执

行人;王同华、李宝和郭一鸣完成数据分析,论文初稿的写作;李宝、郭一鸣、张瑶婷和刘新红参与实验设计,试验结果分析;范连益、曲亮和邓力超对论文进行了论文修改和数据核对;李莓是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由湖南省农业科学院科技创新项目(2019YC02)和国家油菜产业技术体系(CARS-12)共同资助。感谢刘智博士在为本研究提供了目标候选基因序列信息。

参考文献

- Chen H.Q., Sui C., and Wei J.H., 2009, Summary of strategies for developing SSR primer, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(4): 845-851. (陈怀琼, 隋春, 魏建和, 2009, 植物 SSR 引物开发策略简述, 分子植物育种, 7(4): 845-851.)
- Fu T.D., 1995, Breeding and utilization of rapeseed hybrid, Hubei Science and Technology Press, Hubei, China, pp. 60-61. (傅廷栋, 1995, 杂交油菜的育种与利用, 湖北科学技术出版社, 中国, 湖北, pp.60-61.)
- He D.H., Lei Z.P., and Xing H.Y., 2009, Development progress characteristics and application of functional marker, *Xibei Nonglin Keji Daxue Xuebao (Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition)*, 37(1): 110-116, 121. (贺道华, 雷忠萍, 邢宏宜, 2009, 功能标记的开发、特点和应用研究进展, 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 37(1): 110-116, 121.)
- Jean M., Brown G.G., and Landry B.S., 1997, Genetic mapping of nuclear fertility restorer genes for the Polima cytoplasmic male sterility in canola (*Brassica napus* L.) using DNA markers, *Theor. Appl. Genet.*, 95(3): 321-328.
- Li H.B., 2016, Mapping and candidate gene analysis of purple leaf gene *BnaA.PL1* in *Brassica napus* L., Dissertation for Ph. D., Huazhong Agricultural University, Supervisor: Fu T.D., pp.48-54. (李海渤, 2016, 甘蓝型油菜紫叶基因 *BnaA.PL1* 定位和候选基因分析, 博士学位论文, 华中农业大学, 导师: 傅廷栋, pp.48-54.)
- Liu G.S., and Zhang D.L., 2016, The application of the functional molecular marker in wheat breeding, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 32(11): 18-29. (刘国圣, 张大乐, 2016, 功能性分子标记在小麦育种中的应用, 生物技术通报, 32(11): 18-29.)
- Liu P.W., Li Y., He Q.B., and Yang G.S., 2007, Identification of

- genetic markers for the Pol-CMS restorer gene in *Brassica napus* L., *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Oil Crop Sciences), 29(1): 14-19. (刘平武, 李赞, 何庆彪, 杨光圣, 2007, 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*, 29(1): 14-19.)
- Liu Z., 2012, Fine mapping and candidate gene analysis of the nuclear restorer gene for Pol-CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.), Dissertation for Ph.D., Huazhong Agricultural University, Supervisor: Yang G.S., pp.51-56. (刘智, 2012, 甘蓝型油菜 Pol-CMS 恢复基因的精细定位与候选基因分析, 博士学位论文, 华中农业大学, 导师: 杨光圣, pp.51-56.)
- Liu Z., Liu P.W., Long F.R., Hong D.F., He Q.B., and Yang G.S., 2012, Fine mapping and candidate gene analysis of the nuclear restorer gene *Rfp* for Pol-CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 125(4): 773-779.
- Mei D.S., Li Y.C., Hu Q., Li Y.D., and Xu Y.S., 2006, Identification of seed purity of *Brassica napus* 'Zhongyouza8' using SSR markers, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 22(5): 49-52. (梅德圣, 李云昌, 胡琼, 李英德, 徐育松, 2006, 甘蓝型油菜中'油杂8号'种子纯度的 SSR 鉴定, *中国农学通报*, 22(5): 49-52.)
- Natasa F., Li X.Q., Ferrie Alison M.R., DePauw M., Keller W.A., Landry B., and Brown G.G., 2006, Towards positional cloning in *Brassica napus*: generation and analysis of doubled haploid *B. rapa* possessing the *B. napus* Pol-CMS and *Rfp* nuclear restorer gene, *Plant Mol. Biol.*, 61(1): 269-281.
- Natasa F., Rachel S., Rachel G., Laetitia M., Martin L., Benoit S. L., and Gregory G.B., 2010, High-resolution mapping of the *Brassica napus* *R fp* restorer locus using Arabidopsis-derived molecular markers., *Theor. Appl. Genet.*, 120 (4): 843-851.
- Song X.H., 2013, Cloning and characterization of resistance gene candidate sequences in two ornamental plants and application of molecular markers for powdery mildew resistance in gerbera, Dissertation for Ph.D., Northwest A&F University, Supervisor: Ma Q., pp.49-51. (宋晓贺, 2013, 非洲菊和彩叶芋抗病基因同源序列的分离鉴定和抗白粉病分子标记, 博士学位论文, 西北农林科技大学, 导师: 马青, pp. 49-51.)
- Tang R., Wu Y.X., Tian Z.P., Zhang M., and Wang T.Q., 2007, Hybrid purity identification of Guiyou519 with yellow seeds by SSR, *Guizhou Nongye Kexue* (Guizhou Agricultural Sciences), 35(3): 10-11. (唐容, 吴有祥, 田筑萍, 张敏, 王通强, 2007, 利用 SSR 标记对甘蓝型黄籽油菜贵油 519 杂种纯度鉴定, *贵州农业科学*, 35(3): 10-11.)
- Wang H.L., Han J.J., Li M.M., Nan F.B., and Li W.J., 2014, Development and application of functional markers in cereal crops, *Henongxue Bao* (Journal of Nuclear Agricultural Sciences), 28(11): 1963-1971. (王昊龙, 韩俊杰, 李淼淼, 南富波, 李卫华, 2014, 功能标记的开发及在禾谷类作物中的应用, *核农学报*, 28(11): 1963-1971.)
- Wang P.Q., Zhou Y.F., Xu Y.B., Hu J.B., and Yang L.M., 2016, Development of SSR markers based on multiple sequence alignment and their applications in melon, *Henan Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Henan Agricultural University), 50(2): 189-197. (王盼乔, 周亚峰, 许彦宾, 胡建斌, 杨路明, 孙守如, 2016, 基于多序列比对的甜瓜 SSR 标记开发及应用, *河南农业大学学报*, 50(2): 189-197.)
- Wang X.C., Jiang S.L., Shangguan L.F., Cao Y.F., Qiao Y.S., Zhang Z., and Fang J.G., 2010, Development of EST-derived SSR markers for pear and evaluation of their application in pear genetic diversity analysis, *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 43(24): 5079-5087. (王西成, 姜淑苓, 上官凌飞, 曹玉芬, 乔玉山, 章镇, 房经贵, 2010, 梨 EST-SSR 标记的开发及其在梨品种遗传多样性分析中的应用评价, *中国农业科学*, 43(24): 5079-5087.)
- Wang Y.X., Zhao R.B., Ding J.Q., Zhang X.C., Chen J.F., Wu K., and Wu J.Y., 2009, Development of novel markers of the resistance gene *rscmv1* to maize dwarf mosaic, *Henan Nongye Kexue* (Journal of Henan Agricultural Sciences), 38(8): 84-87. (王永霞, 赵荣兵, 丁俊强, 张学才, 陈甲法, 武轲, 吴建宇, 2009, 玉米矮花叶病抗病基因 *Rscmv1* 新型标记的开发, *河南农业科学*, 38(8): 84-87.)
- Yang G.S., Fu T.D., Ma C.Z., and Yang X.N., 1996, Establishment of a random-mating population of 'Polima' CMS restorers in *Brassica napus* by use of dominant genic male sterility, *Plant Breeding*, 115(5): 391-394.
- Yang J.H., Wang S.W., Liu X.Y., Yang J.F., and Zhang M.F., 2008, Development and application of functional markers in higher plants, *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 41(11): 3429-3436. (杨景华, 王士伟, 刘训言, 杨加付, 张明方, 2008, 高等植物功能性分子标记的开发与利用, *中国农业科学*, 41(11): 3429-3436.)
- Zeng F.Q., Yi B., Tu J.X., and Fu T.D., 2009, Identification of AFLP and SCAR markers linked to the male fertility restorer gene of Pol-CMS (*Brassica napus* L.), *Euphytica*, 165(2): 363-369.
- Zhan Z.X., Jiang Y.F., Zhu Z.Y., Zhang C.S., Yang Q.Y., Li Q., Hou Z.K., Gong J.F., Cheng Y.G., Wu J.S., Fu T.D., Zhou Y.M., Piao Z.Y., and Zhang C.Y., 2015, Development of close linked marker to PbBa8.1 conferring canola resistance to *Plasmodiophora brassicae*, *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Oil Crop Sciences), 37(6): 766-771. (战宗祥, 江莹芬, 朱紫媛, 张春沙, 杨庆勇, 李倩, 侯照科, 龚建芳, 程雨贵, 吴江生, 傅廷栋, 周永明, 朴钟云, 张椿雨, 2015, 与位点 PbBa8.1 紧密连锁分子标记的开发及甘

- 蓝型油菜根肿病抗性育种, 中国油料作物学报, 37(6): 766-771.)
- Zhang H.L., Yang Z.H., Hu Z.Z., Zhu J.H., and Zhang A.C., 2013a, Development of genomic microsatellite marker for *Phytophthora infestans*, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao* (Journal of Agricultural Biotechnology), 21(9): 1110-1118. (张宏磊, 杨志辉, 胡珍珠, 朱杰华, 张奥川, 2013a, 致病疫霉基因组微卫星标记开发, 农业生物技术学报, 21(9): 1110-1118.)
- Zhang H.L., Zhu J.H., Hu Z.Z., and Yang Z.H., 2013b, Detection and analysis of microsatellites in the *Phytophthora infestans* genome, *Beifang Yuanyi* (Northern Horticulture), 37(17): 110-114. (张宏磊, 朱杰华, 胡珍珠, 杨志辉, 2013b, 致病疫霉基因组序列微卫星的发掘与开发分析, 北方园艺, 37(17): 110-114.)
- Zhao H.X., Li Z.J., Hu S.W., Sun G.L., Chang J.J., and Zhang Z.H., 2010, Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by a multiplex PCR assay, *Theor. Appl. Genet.*, 121(4): 643-650.
- Zhu G.Z., Dai W.M., Chen X.F., Zhang J.X., and Qiang S., 2015, Development of molecular markers in weedy rice chloroplast based on genomic database, *Nanjing Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Nanjing Agricultural University), 38(2): 240-247. (朱国忠, 戴伟民, 陈晓锋, 张晶旭, 强胜, 2015, 基于基因组数据库的杂草稻叶绿体分子标记开发, 南京农业大学学报, 38(2): 240-247.)