

不结球白菜 SSR 引物的高效开发及其通用性研究

Development of SSR Primers of Non-heading Chinese Cabbage and Transferability among Closely Related Species

崔秀敏/CUI Xiu-min¹, 侯喜林/HOU Xi-lin¹, 董玉秀/DONG Yu-xiu²

1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

2. 山东农业大学生命科学院, 山东泰安 271018

1. National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2. College of Life Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China

[摘要] 利用改进的 ISSR-PCR 分离不结球白菜基因组微卫星, 进行两步 PCR, 分别设计出 SSR 两端引物 IP₂ 和 IP₃ (即 SSR 引物对), SSR 引物产率为 12%, 明显高于传统方法。不结球白菜 SSR 序列以 (GA)_n 为主, 占 70%。将 69 对 SSR 引物用于芸苔属其它 8 种作物的扩增, 97% 引物有显著扩增, 扩增率最高的为四倍体白菜和甘蓝 (85.5%), 最低的为青花菜 (49.3%)。10 对为通用引物, 在所检测的 8 种作物中片段大小一致, 其余的扩增片段和数目差异较大, 表现出较为丰富的多态性。尤其是在 C 基因组的甘蓝和花椰菜上, 最多可检测到 5 个位点, 表明运用 ISSR-PCR 开发出的引物多态性较高。

[关键词] 不结球白菜, SSR 引物, 微卫星, 通用性

[中图分类号] S634.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2005)11-0020-04

Abstract: Modified ISSR-PCR method was presented for isolating microsatellites from non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) genomic DNA. The method was carried out through a two-step PCR, and then primers (IP₂ and IP₃) were designed according to the flanking sequence of microsatellite. The success rate was 12%, which is significantly higher than that of traditional method. The SSR sequence was mainly (GA/CT)_n, which was in the majority of 70%. 69 pairs of SSR primers were amplified among eight *Brassica* types, of which 97% primers had evident amplified bands. The highest amplification rate was 85.5%, occurring in non-heading Chinese cabbage with tetraploid and *Brassica oleracea* L. And the lowest was 49.3% in *Brassica var. botrytis* L. of above 69 pairs, 10 pairs were transferable among eight *Brassica* types, whose amplified fragments were the same, whereas others were diverse in size and number, showing higher polymorphic. Especially in *Brassica oleracea* L. and *Brassica var. botrytis* L., which were typical C chromosome types, five loci were tested at most, suggesting these primers developed by ISSR-PCR had rich polymorphic.

Key Words: non-heading Chinese cabbage, SSR primer, microsatellite, transferability

CLC Number : S634.3

Document Code : A

Article ID : 1000-7857(2005)11-0020-04

微卫星 DNA, 又称 SSR (Simple Sequence Repeat), 是一类由 1~6 个碱基组成的基序串联重复序列。其核心序列重复次数不同, 且重复序列两侧多是相对保守的单拷贝序列, 因而可利用其两端保守序列为引物, 对基因组总 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增片段的长度多态性可用作分子标记。微卫星标记多态性丰富, 重复性好, 标记多呈共显性, 在基因组中散在分布, 已广泛应用于遗传图谱构建、品种指纹图谱绘制、品种纯度检测及目标性状分子标记。

芸苔属作物是全球范围内重要的经济作物, 包括 A、B、C 3 种基因组类型。长期的自然进化和人工选择使不同基因组间相互渗透, 变异丰富, 遗传背景异常广泛。相对于水稻、小麦、大豆等作物, 芸苔属 SSR 标记较少^[1,2], 已有标记很多来自拟南芥。传统的微卫星分离需构建基因组文库, 用放射性同位素或地高辛等标记的 SSR 探针与文库杂交, 需要花费大量人力、财力, 而且效率较低^[3-5]。2001 和 2002 年 Lian 等^[6,7]报道了基于 ISSR-PCR 扩增的微卫星分离方法,

在日本红松等植物中分离成功。本文运用此方法首次在不结球白菜上成功分离微卫星引物, 并对其在近缘种间进行了通用性研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料

不结球白菜品种: 暑绿和寒笑, 其它植物材料见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

收稿日期: 2005-05-31

基金项目: 国家“863”计划项目(2003AA207120)

作者简介: 崔秀敏, 女, 南京市卫岗 1 号南京农业大学园艺学院, 博士后, 主要研究方向为园艺植物分子育种;

E-mail: xiumincui@sina.com.cn

表1 SSR引物通用性扩增植物材料
Table1. Plant materials for transferability of SSR primers

物种	拉丁学名	染色体类型
乌塌菜	<i>Brassica.narinosa</i> L.H.Bai Ley	AA, 2n=2X=20
大白菜	<i>Brassica. Campestris</i> L. Pekinensis (Lour.) Rapr	AA, 2n=2X=20
四倍体小白菜	<i>Brassica campestris</i> ssp. chinensis Makino	AA, 2n=4X=40
结球甘蓝	<i>Brassica oleracea</i> L.var. capitata.	CC, 2n=2X=18
花椰菜	<i>Brassica oleracea</i> L.var. botrytis L.	CC, 2n=2X=18
青花菜	<i>Brassica oleracea</i> L. var. italica P.	CC, 2n=2X=18
芥菜	<i>Brassica. Juncea</i> (L.) Czern.et Coss	AABB, 2n=2X=36
萝卜	<i>Raphanus. Sativus</i> L.	NN, 2n=2X=18

采用改良的 CTAB 大量提取法^[8]。新鲜叶片 5 g,液氮中研磨成粉,移入 50 ml 离心管,加 20 ml 65℃预热的 CTAB 提取液,快速混匀,65℃保温 1 h,期间每隔 15 min 轻摇一次离心管。加入等体积氯仿:异戊醇(CI,24:1)抽提 3 次。加入等体积预冷异丙醇,冰箱放置 2~3 h,离心,弃上清。10 ml 70%乙醇洗涤 2 次,无水乙醇洗涤 1 次,37℃干燥。加 100 μl ddH₂O 溶解后,加 10 mg/ml RNase 5 μl,37℃保温 1 h,取 5 μl 0.8%琼脂糖电泳检测 RNA 是否除净,其余 4℃保存。若 DNA 不纯,可按以下步骤纯化:等体积的 CI 抽提后,取上清加 1/10 体积的 NaAC(pH5.2)和 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA,于-20℃静置 30 min;将絮状沉淀轻轻移出,用 70%乙醇洗 2 次,37℃干燥,溶于 50 μl ddH₂O,将 DNA 浓度调整为 500 mg/μl。

1.2.2 基因组酶切

20 μl 反应体系包括:11 μl ddH₂O + 2 μl 10×Buffer + 6 μl DNA+1 μl *EcoR* V,37℃酶切 3~4 h。取 5 μl 酶切产物 1%琼脂糖电泳检测。若带型弥散,则于 70℃水浴 15 min,灭酶活。然后加 2 μl 3M NaAC(pH5.2)和 40 μl 无水乙醇沉淀,12 000 rpm,离心 5 min,弃上清,干燥。沉淀用 2 μl ddH₂O 回溶。

1.2.3 接头连接

平端接头由一段 48 bp 长链 (P1: 5'-GTAATACGACTCAC-TATAGGGCACGCGTGGCGACGGCCCGGGCTGCT-3')(下划线序列为 AP₁,黑斜体为 AP₂)和一段 8 bp 且 3'端带有氨基的短链(P2: 5'-ACCAGCCC-NH₂-3') 组成。10 μl 连接体系包括:2 μl 回溶 DNA+5 μl Solution + 1 μl P1 (50 pmol/μl)+1 μl P2 (50 pmol/μl)+1 μl T4 Ligase (Promega), 连接液 4℃过夜。然后加 1 μl 3 mol/L NaAC(pH5.2)和 2 倍体积无水乙醇沉淀,12 000 rpm 离心 5 min,弃上清,干燥,加 100 μl ddH₂O 回溶。

1.2.4 ISSR-PCR 片段克隆

用已加接头序列的 DNA 酶切片段作为模板,以 S1:(AG)₁₀ 及接头引物 AP₁ (5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3') 进行 PCR 扩增。50 μl 体系包括:2μl DNA + 5 μl 10×Buffer(含 Mg²⁺) + 4 μl dNTP (2.5 m mol/L each) +2μl AP₁ (10pmol/μl)+2 μl S1 (10 pmol/μl)+0.5 μl Taq polymerase+34.5 μl ddH₂O,PCR 反应程序为 94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,56℃复性 45 s,72℃延伸 45 s 35 个循环,72℃延伸 8 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,如带型弥散,则将 PCR 产物直接与 pMD-18T 载体连接 3 h 或过夜。

1.2.5 菌落 PCR 鉴定及一侧引物设计

取 5 μl 接产物转化大肠杆菌感受态细胞。挑取阳性克隆,LB 液体培养基振荡培养过夜。直接取液体培养液 1 μl,进行菌落 PCR 鉴定。20 μl 反应体系包括:1 μl 菌液+2 μl 10×buffer+ 1.2 μl Mg²⁺Cl₂(25 m mol/L)+1.6 μl dNTP (1.25 mM) +0.8 μl S₁+0.8 μl AP₁+0.2 μl Taq polymerase+11.4 μl ddH₂O,反应程序同上。取 10 μl PCR 产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。选取介于 150~1 000 bp 之间的克隆进行测序。根据测序结果,在接头序列与微卫星序列之间设计 27 bp IP₁ 引物,再在 IP₁ 与微卫星序列间设计 21 bp IP₂ 引物,以备巢式 PCR 用。

1.2.6 巢式 PCR 扩增及另一侧引物设计

依次用 IP₁ 和 AP₁,IP₂ 和 AP₂ 进行 2 次 PCR 扩增。第一次 PCR 反应混合液 20 μl,2 μl 接头 DNA + 2 μl 10×Buffer + 1.2 μl Mg²⁺Cl₂ +1.6 μl dNTP +0.8 μl AP₁ +0.8 μl S₁ +0.2 μl Taq polymerase+13.4 μl ddH₂O,反应程序同上。将第一次 PCR 产物稀释 50 倍取 1 μl 作为第二次 PCR 反应模板,引物为 IP₂ 和 AP₂,其它同第一次 PCR。两次 PCR 反应的复性温度均根据 IP₁、IP₂ 不同作适当调整。取 5 μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。选择长度适中的巢式 PCR 产物进行克隆、测序,根据测序结果设计微卫星 DNA 另一侧的引物 IP₃。IP₂ 和 IP₃ 即为开发的 SSR 引物。

1.2.7 通用性检测

扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、凝胶成像系统拍照统计。

2 结果与分析

2.1 基因组提取质量及酶切效果

基于 AFLP-DNA 原理的 ISSR-PCR 对 DNA 质量要求较高。从图 1 可以看出,CTAB 改良法提取的基因组 DNA 条带清晰, RNA 已经清除干净,DNA 质量较高。酶切产物电泳检测呈弥散状,大多数 DNA 片段位于 100~2 000 bp 之间。

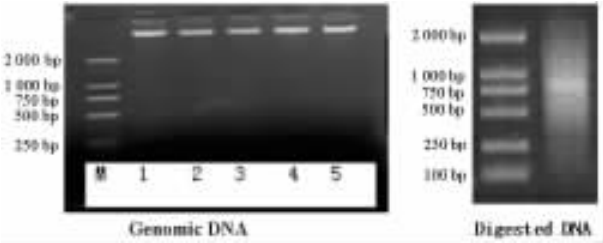


图1 白菜基因组 DNA 和酶切图

Figure 1 Genomic DNA and Smear DNA Digested by Restriction Endonuclease

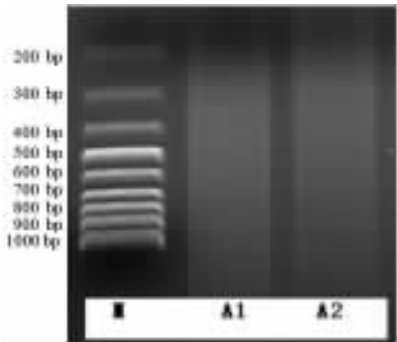


图2 连接产物的 PCR 扩增

Figure 2 PCR amplification of adaptor-ligated DNA

2.2 连接产物的 PCR 扩增

酶切 DNA 片段连接接头序列后,以 AP₁+(AG)₁₀ 为引物进行 PCR 扩增,电泳结果如图 2 所示,扩增产物电泳呈均匀弥散状,表明各种不同大小的 AFLP-DNA 片段被扩增。

2.3 两步法 PCR 连接产物的克隆、转化

扩增产物转化大肠杆菌,共得到 500 多个阳性克隆。随机选取 250 个,以 AP₁+S₁ 为引物进行菌落 PCR(单、双引物)鉴定,结果表明,其中 85%阳性克隆包含微卫星序列。挑取 200 个克隆进行测序,结果表明,除少数序列中 AP₂ 与(AG)_n 间距离太近,难以进行引物设计外,146 个克隆可在 AP₂ 与(AG)_n 间设计 IP₁、IP₂ 引

物。

利用 IP_1+AP_1 和 AP_2+IP_2 两对引物进行巢式 PCR, 54 对 (37%) 引物有扩增产物且为双引物带。将其 PCR 产物克隆、测序。结果表明, 50 个序列 (92%) 含有 SSR 序列, 其中 29 个 (58%) 可以设计另一侧引物 IP_3 。微卫星 DNA 一侧引物为 IP_2 , 在微卫星 DNA 与接头序列间设计另一侧引物 IP_3 (注意方向性), IP_2 与 IP_3 即为开发的 SSR 引物。

以 IP_2 和 IP_3 为引物, 以基因组 DNA 为模板, 25 对 (86%) 引物有明显扩增。加上已知序列中间 SSR, 共得到 30 对有效 SSR 引物, 产率为 12%。另有 S2:(AC)₁₀(SSR 引物得率为 9.33%) 开发的 39 对引物, 用于通用性扩增的总共 69 对。

2.4 分离到的微卫星序列及 SSR 引物在近缘种间的通用性

由表 2 可以看出, 不结球白菜基因组微卫星以二核苷酸基元为主, (GA/CT)_n 占分离总克隆的 70%, (CA/GT)_n 占 13%。三核苷酸仅发现了 (GGA)_n、(GAA)_n 两个序列, 且重复次数较低。而多核苷酸序列出现的概率更低, 只有 2.9%。在近缘种芜菁 (*B.rapa*)、甘蓝型油菜 (*B.napus*) 上也以 (GA)_n 最多, 分别达到 71% 和 89%^[1,9]。这说明芸苔属微卫星基本以 (GA)_n 为主, 但很多 (GA)_n 并不完整, 因此成就了不同物种间丰富的遗传多样性。实验结果表明, (GA)_n 与 (CA)_n 微卫星的多态性并无显著差异, 微卫星基元的重复数目与等位基因间也无明显相关, 这种说法在油菜上曾报道^[10,11]。而在苹果^[12]、大麦^[13]上微卫星与等位基因间则呈弱相关甚至紧密相关, 说明不同物种间二者关系存在显著差异。

表 2 不结球白菜中分离到的微卫星

Table 2. Numbers of microsatellites isolated from small-insert genomic library

重复基元 Core sequence	微卫星数目 Number of microsatellites	重复数目 Repeat times	占总微卫星比例 (%) Percent of total microsatellites
A/T	4	13~18	5.8
AT/TA	1	5	1.4
GA/CT	49	5~51	71
GT/CA	9	5~18	13
GGA, GAA	4	5~7	5.8
GGGT, GTTT	2	4~5	2.9

表 3 SSR 引物在近缘种间的通用性

Table 3. Transferability of SSR primers among closely related species

物种 Species	有明显扩增的引物数 The number of primers evidently amplified (%)	总扩增条带数 Number of total bands	平均每条引物扩增带 Everage number of bands percent primer simplified	强带数 Number of strong ands (%)	弱带数 Number of weak bands (%)
不结球白菜 <i>B. Chinensis</i>	69 (100)	82	1.19	74 (90.2)	8 (9.8)
乌塌菜 <i>B.narinosa</i>	46 (66.7)	50	1.09	34 (68)	16 (32)
大白菜 <i>B. Pekinensis</i>	44 (63.7)	51	1.16	33 (64.7)	18 (35.3)
四倍体白菜 <i>B. Chinensis</i>	59 (85.5)	69	1.17	44 (63.8)	25 (36.2)
结球甘蓝 <i>B.Oleracea</i>	59 (85.5)	76	1.29	51 (67.1)	25 (32.9)
花椰菜 <i>B. Botrytis</i>	34 (49.3)	44	1.29	25 (56.8)	19 (43.2)
青花菜 <i>B. Botrytis</i>	53 (76.8)	56	1.06	43 (76.8)	13 (23.2)
芥菜 <i>B. Juncea</i>	46 (66.7)	49	1.07	38 (77.6)	11 (22.4)
萝卜 <i>Raphanus</i>	44 (63.8)	59	1.34	41 (69.5)	18 (30.5)

由表 3 可以看出, 69 对不结球白菜 SSR 引物在 8 种作物中的通用性扩增率在 49.3%~85.5%。除了在花椰菜上的扩增率较低外, 在其它 7 种作物上的扩增率均在 60% 以上。虽然 4 倍体白菜是由 2 倍体直接加倍而来, 但也只有 85.5% 的引物扩增率, 推测染色体加倍或后代自交过程中发生了某些染色体突变、缺失及不等位交换。SSR 引物在结球甘蓝 (C 基因组) 上较高的扩增率, 单从染色体组成上似乎无法给出合理的解释。但有研究表明^[9,14,15], A 基因组 (*B.rapa*) 和 C 基因组 (*B. Oleracea*; *B. napus*) 引物的通用性高于 A 和 B (*B.nigra*) 基因组。

SSR 引物在结球甘蓝上扩增率较高, SSR 引物的多态性也较高。SSR 引物多态性最高表现在亲缘关系较远的萝卜上, 每条引物平均有 1.34 条扩增带, 最多的检测到 5 个位点。其次为 C 基因组的甘蓝和青花菜, 每条引物平均扩增带为 1.29, 最低的在青花菜和芥菜上, 分别为 1.06 和 1.07。在 69 对 SSR 引物中, 绝大部分扩增产物有 1~2 条主带, 表明引物在物种间以共显性方式仅检测到 1~2 个位点, 芥菜和萝卜上扩增片段大小变异较大, 这非常有利于连锁图谱的整合^[2,14]。只有 2 对引物仅在不结球白菜二倍体中有扩增, 为品种特异标记。有 24 对 (约 1/3) SSR 引物在所有物种内均有扩增, 但片段大小和数目差异较大, 说明开发出的 SSR 引物在芸苔属近缘种间具有丰富的多态性。其中 10 对引物在所有物种内片段大小一致, 为通用性引物。通用分子标记可以有效弥补物种分子标记不足, 丰富标记数量, 从而有利于构建高密度遗传图谱。

3 讨论与结论

ISSR-PCR 依据 AFLP-DNA 原理, 用限制性内切酶酶切基因组 DNA, 加接头构建 AFLP-DNA 文库, 然后用相应的接头及 SSR 探针为引物筛选目标序列, 避免了使用放射性探针标记和繁琐的杂交, 安全方便, 微卫星得率达 12%, 远高于传统方法的百分之几甚至千分之几^[4,5]。实验通过菌落 PCR 双重鉴定显著降低了重复克隆和无效克隆。ISSR-PCR 的缺陷在于: 一是需要 2~3 次克隆、测序, 在没有测序仪的实验室开发成本较高; 二是若微卫星 DNA 重复次数太多, 容易出现部分碱基难以识别的现象, 导致测序中断。

不结球白菜微卫星序列以 (GA/CT)_n 为主, 与芜菁^[1]、油菜^[9]上的报道一致, 充分说明 A、C 染色体同源性较高。SSR 引物在近缘 8 物种间扩增时, PCR 反应条件因作物而异, 由于基因组的差异, 与同一种引物结合的适宜退火温度可能不同。因此, 应尽量使同一引物在各作物最适宜的退火温度下反应。本研究获得的 SSR 引物多态性不是很高, 如要深入细致地揭示物种间的遗传多态性或者构建遗传连锁图谱, 还需进一步用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 这项工作正在进行中。

参考文献 (References)

- [1] Suwake K, Iketani H, Nunome T, et al. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, 104:1 092~1 098
- [2] Lowe A J, Jones A E, Ratbould A F, et al. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 2:7~11

水稻核心种质育种

Rice Core Germplasm Breeding

周少川/ZHOU Shao-chuan^{1,2}, 李 宏/LI Hong¹, 黄道强/HUANG Dao-qiang¹, 卢德城/LU De-cheng¹

- 1. 广东省农业科学院水稻研究所,广州 510640
- 2. 湖南农业大学农学院,长沙 410128

- 1. Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China
- 2. Agricultural School, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

[摘要] 从核心种质的概念与核心种质育种、核心种质株型和品质理想模型构建、新型核心种质的创建、核心种质分子育种、特征次生物质标记辅助核心种质育种 5 个部分,概述了水稻核心种质育种从提出到完善的全过程,并进一步提出了水稻核心种质育种探索的重点。

[关键词] 核心种质,育种,水稻 **[中图分类号]** S603.6, S511, S5-033
[文献标识码] A **[文章编号]** 1000-7857(2005)11-0023-04

Abstract : The paper outlines the history from proposal to consummation of rice core germplasm breeding in five parts, including conception of core germplasm (CG) and core germplasm breeding, construction of ideal model of plant type and quality of CG, creation of new CG, molecular breeding of CG, CG breeding through aided selection by specific secondary metabolite. The approach to rice core germplasm breeding is advanced.

Key Words : core germplasm, breeding, rice **CLC Numbers :** S603.6, S511, S5-033
Document Code: A **Article ID :** 1000-7857(2005)11-0023-04

迄今为止,水稻育种学仅利用了约 5%的水稻种质资源,即取得了以矮化育种为标志的“绿色革命”和杂种优势利用为标志的两次重大突破,水稻种质资源学的重要性是毋庸置疑的,如何

应用现代科学,进一步利用水稻种质资源实现水稻育种的新突破,是当代水稻科技工作者的重任。优质稻核心种质育种理论提出和完善的目的在于:通过水稻育种学和水稻种质资源学的对

收稿日期:2005-07-12
基金项目:农业部 948 项目(2001-101、2001-103-03、2003-229),国家农业科技跨越计划项目(1999-05、2003-9)
作者简介:周少川,男,广州市五山路广东省农业科学院水稻研究所,研究员,主要从事水稻遗传育种研究;E-mail: xxs123@163.com

[3] Armour J A, Neumann R, Goberts, et al. Isolation of human simple sequence repeats Loci by hybridization selection [J]. *Human Molecular Genetics*, 1994, 3:559~565

[4] Tokuko ujino, Takayuki kawahara, Yoshihiko Tsumura et.al. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for Shorea curtisii and other Dipterocarpaceae species [J]. *Heredity*, 1998,81:422~428

[5] Luchezar Karagyoov, Iveta G Kalchera, Verne M chapman. Construction of random small -insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993,21(16): 3 911~3 912

[6] Lian chunlan, Zhou zhi -hua, Hogetsu T A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of Inter-simple sequence repeat[J]. *J. Plant Res*, 2001,114:381~385

[7] C Lian, T Hogetsu. Development of microsatellite markers in black locust (Robinia pseudoacacia) using a dual-suppression-PCR technique[J]. *Molecular ecology notes*, 2002. 2,211~213

[8] Clark M S. Plant Molecular Biology-A laboratory manual[M]. New York:Springer, 1996. 3~6

[9] L. Tommasini, Batley J, Arnold G. M. et al. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (Brassica napus L.) varieties[J]. *Theor Appl Gene*, 2003, 106:1 091~1 101

[10] Szwec M C, Tadden A K, Kresovich S, et al. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in Cultivated Brassica species[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93:534~538

[11] Vzunovami M I, Ecke W. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (Brassica napus L.)[J]. *Plant Breeding*, 1999,118:323~326

[12] Plaschke J, Ganai M W, Rader M S. Detection of genetic diversity in closely related wheat using microsatellite markers[J]. *Theor Appl Gene*, 1995, 91:1 001~1 007

[13] Saghai Maroof MA, Biyashev R M, Yang G P et.al. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barely: species diversity, chromosomal location and population dynamics [J]. *Proc. Natl. Acad Sci, USA*, 1994, 91:5 466~5 470

[14] Lowe A J, C.Moule, M.Trick, Edwards K J. Efficient large-scale development of microsatellite for marker and mapping application in Brassica crop species[J]. *Theor Appl Genet*, 2003,122: 1 522~1 527

[15] Westman A L, Kresovich S. The potential for cross-taxa simple sequence repeat (SSR) amplification between Arabidopsis thaliana L. and crop Brassicas[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 272~281

(责任编辑 胡春华)