

研究报告

Research Report

芸薹属 B 基因组异附加系材料高效鉴定体系的创建

谭晨¹ 朱开元¹ 向依² 李再云^{2*}

1 浙江省农业科学院花卉研究开发中心, 杭州, 311200; 2 作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉, 430070

* 通讯作者, lizaiyun@mail.huza.edu.cn

摘要 芸薹属 B 基因组包含许多在育种中有用的性状和基因, 然而它的研究却非常有限。为了创建全套甘蓝 - 黑芥单体异附加系来解析 B 基因组, 在本研究中我们针对芸薹属 B 基因组染色体创建了一套以 SSR 分子标记和 FISH 技术为核心的高效、快速、准确地鉴定和筛选体系。利用该体系, 我们在以异源三倍体杂种 ($2n=26$, CC.B) 作为母本, 用亲本甘蓝 ($2n=18$, CC) 作轮回亲本的回交后代中进行异附加系的鉴定和筛选。结果表明, 采用该体系能够准确的鉴定和筛选出在 C 基因组上附加的每一条 B 基因组染色体的单体异附加系 ($2n=19$, CC+1B1-8); 并且效率很高, 仅回交 3 代我们就获得了 7 个不同的单体异附加系。创建的甘蓝 - 黑芥单体异附加系对于黑芥基因组结构和进化的研究以及优良性状的应用都具有重要价值。

关键词 芸薹属, B 基因组, 附加系, SSR, 荧光原位杂交

Establishment of High Efficient Identification System for Alien Addition Lines of B Genome in *Brassica*

Tan Chen¹ Zhu Kaiyuan¹ Xiang Yi² Li Zaiyun^{2*}

1 Research and Development Centre of Flower, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 311200; 2 National Key Lab of Crop Genetic Improvement, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070

* Corresponding author, lizaiyun@mail.huza.edu.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.016.003227

Abstract *Brassica* B genome carries many useful genes and traits for breeding, but the studies on it are quite limited. To dissect the B genome by developing of a complete set of *B. oleracea-nigra* MAALs (monosomic alien addition lines), we created an efficient, rapid and accurate identification and screening system for the *Brassica* B genome chromosomes with SSR molecular markers and FISH as the core in this study. Using this system, we identified and screened MAALs in the backcross progenies of that the triploid F_1 hybrid ($2n=26$, CC.B) was used as the maternal parent and backcrossed successively to parental *B. oleracea* ($2n=18$, CC). Results showed that the MAALs with each of eight different B-genome chromosomes added to C genome ($2n=19$, CC+1B1-8) could be accurately identified and screened by this identification and screening system. Moreover, the efficiency was very high that seven different MAALs were established just within 3 backcross generations. The MAALs of *B. oleracea-nigra* would be valuable for exploiting the genome structure and evolution and using the useful traits of *Brassica* B genome.

Keywords *Brassica*, B genome, MAALs, SSR, FISH

芸薹属(*Brassica*)包含许多具有重要经济价值的甘蓝型油菜(AACC)是最重要的蔬菜或油料作物, 因此, 芸薹属的研究主要集中在了 A、C 基因组油料、蔬菜、饲料和调料作物, 白菜(AA)、甘蓝(CC)和

基金项目 本研究由国家自然科学基金(31371656)资助

引用格式 :Tan C., Zhu K.Y., Xiang Y., and Li Z.Y., 2018, Establishment of high efficient identification system for alien addition lines of B genome in *Brassica*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 16(10): 3227-3233 (谭晨, 朱开元, 向依, 李再云, 2018, 芸薹属 B 基因组异附加系材料高效鉴定体系的创建, 分子植物育种, 16(10): 3227-3233)

上(Prakash et al., 2009; Warwick, 2011)。而作为芸薹属重要组成部分的 B 基因组的研究则相对滞后,黑芥(BB)、芥菜型油菜(AABB)和埃塞俄比亚芥(BBCC)等芸薹属 B 基因组物种中存在许多优良性状,尤其是与抗生物或非生物胁迫相关的性状,诸如黑胫病、高温、干旱、盐碱等(Chevre et al., 1991; 1996; Chèvre et al., 1997; Pradhan et al., 2011; Navabi et al., 2010; 2013),是芸薹属有待发掘的重要基因宝库之一。

异附加系(Alien addition lines)是远缘杂交过程中产生的一种比较有价值的非整倍体材料,它是指一个物种的一条或多条外源染色体附加到另一物种的染色体组中所产生的个体,其中附加一条外源染色体的个体称为单体异附加系(monosomic alien addition lines, MAALs)。单体异附加系(MAALs)尤其是全套的单体异附加系是研究物种起源与进化、比较基因组学、鉴别基因连锁群、特殊性状定位以及遗传育种的重要材料(Prakash et al., 2009)。芸薹属全套单体异附加系材料的获得还十分有限,尤其是对于二倍体栽培种,仅有 C 基因组获得了成功(Heneen et al., 2012; Zhu et al., 2016)。芸薹属 B 基因组全套单体异附加系材料一直未能获得,自上世纪八九十年代起就有很多研究者尝试将 B 基因组染色体附加到甘蓝型油菜或甘蓝中,但一直没有获得全套的 8 个单体异附加系(Jahier et al., 1989; Struss et al., 1991; 1992; 1996; Chevre et al., 1991; 1996; Chèvre et al., 1997),其原因主要是没有合适的鉴定手段,早期主要采用的是经典细胞学手段、生化标记或 RFLP/RAPD 标记等分辨率低或耗时耗力的技术手段,难以进行高效准确的鉴定。

对外源染色体高效准确的鉴定是创建异附加系材料的关键,随着技术的不断发展和研究水平的不断提高,鉴定手段从早期的细胞学鉴定、生化标记鉴定、表型鉴定等发展到现代的原位杂交鉴定和分子标记鉴定(Prakash et al., 2009),用于鉴定异附加系的手段越来越便捷和准确,尤其是原位杂交技术和分子标记技术的发展为异附加系的鉴定提供了强大的技术支持。原位杂交技术(*in situ* Hybridization)是利用探针在组织或细胞内进行分子杂交的分子细胞学技术,根据探针的不同可以分为基因组原位杂交(GISH)和荧光原位杂交(FISH)两种,该技术具有特异性强、灵敏度高、结果直观等优点,已被广泛应用到异附加系的鉴定中(Kang et al., 2014; Chen et al., 2014; Zhu et al., 2016),GISH/FISH 技术相较于分子标记技术不仅能够确定外源染色体是否存在,而且能够确

定其拷贝数(单体、二体)及存在类型(附加、代换或易位),从而进一步确保了异附加系鉴定的准确性。分子标记是 DNA 水平上的标记,具有良好的稳定性、标记数量多、检测结果可靠且不受组织器官及发育时期影响等优点,是异附加系鉴定的理想标记。在异附加系鉴定中运用的分子标记主要包括 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 等几种类型(Chevre et al., 1991; Tan et al., 2005; Kang et al., 2014; Chen et al., 2014; Zhu et al., 2016)。不同的鉴定方法也还都存在一定的局限性,因此在鉴定过程中往往需要多种方法同时使用,从而保证鉴定结果的准确性。

在本研究中,我们针对芸薹属 B 基因组染色体创建了一套以 SSR 分子标记和 FISH 技术为核心的高效、快速、准确地鉴定和筛选体系,从而创建了一套甘蓝-黑芥单体异附加系材料,为解析芸薹属 B 基因组染色体结构与进化及其种质资源的利用提供科学依据。

1 结果与分析

1.1 分子标记鉴定

本研究通过文献查阅找到并合成了被广泛报道的可靠性好的 B 基因组 SSR 分子标记,通过亲本间分子标记带型多态性的筛选,其中 45 对可以成功用于本研究,这些标记的染色体位置是已知的,可以用于区分 B 基因组的染色体,此外,Guo 等(2012)报道的 4 对 B 基因组染色体的锚定标记在本研究中也适用。因此,本研究中共采用了 49 对 B 基因组 SSR 标记(表 1),这些标记都能成功进行 PCR 扩增且带型清晰稳定,不仅能够成功区分 B/C 基因组染色体,而且能够成功地区分每一条 B 基因组染色体(图 1)。利用这些标记,我们在每一代回交后代植株中初步筛选出附加了 B 基因组染色体的单株,根据标记信息初步推测其附加了哪条或哪些黑芥染色体。

1.2 普通细胞学鉴定

经过分子标记鉴定初步筛选出来的植株,采用普通细胞学的方法来确认其染色体数目(图 2)。结果表明,随着回交世代的增加,外源染色体逐渐丢失,染色体数目呈现减少的趋势(表 2)。另外,染色体数目与分子标记结果基本一致,染色体数目分别为 $2n=24, 20, 19$ 的植株体细胞。也有极少数单株的染色体数目不一致,这些材料的染色体组成可能发生了增加或丢失,需要采用原位杂交技术进一步确认。

表 1 不同 B 基因组染色体特异 SSR 标记

Table 1 SSR markers belong to each B-genome chromosome

引物名称 Primer names	黑芥连锁群 <i>B. nigra</i> lin- kage group	从头距离(cM) Distance from top (cM)	预期产物大小(bp) Expected product size (bp)
sJ3838F	B1	0.0	270~280
sJ4933	B1	27.8	335~341
sJ84165	B1	34.5	288~334
sJ0644	B1	47.7	438~451
sJ3891	B1	61.4	100~110
sB0563I	B1	78.3	436~438
sJ6846	B2	0.0	319~372
sB1870	B2	0.0	481~489
sJ3302RI	B2	10.0	392~409
sJ03104	B2	45.7	380~390
sJ7079	B2	59.1	211~214
sB4817R	B2	65.8	250~364
sJ3627R	B3	10.6	283~291
sB1822	B3	17.5	250~267
sB1672	B3	37.7	191~256
sJ7046	B3	41.1	277~287
sB1990F	B3	51.1	491~498
sB1752	B3	61.5	406~422
Ni4F09	B3	-	219
sB2131	B4	0.0	311~321
sA0306	B4	16.8	362~396
sB0372	B4	20.1	233~245
sB2141AI	B4	26.8	381~389
sB1935A	B4	40.4	257~260
Ni2E05	B4	-	165
sB0202I	B5	0.0	108~187
sB3140	B5	6.6	230~243
sJ3874I	B5	9.9	164~185
sJ6842	B5	19.9	331~358
sB2556	B5	23.3	208~213
sB3872	B5	60.9	276~183
Ni2D10	B5	-	201
sB31138	B6	0.0	188~199
sJ7104	B6	35.5	322~337
sJ0338	B6	45.6	307~341
sJ1505	B6	59.2	268~327
sJ3640I	B6	82.9	327~346
Ni4A10	B6	-	303
sB1871	B7	0.0	417~423
sJ39119I	B7	25.8	329~388
sJ13133	B7	25.8	294~300
sJ1536	B7	29.5	210~213
sB1937	B7	42.8	262~279
sJ4633	B7	64.4	307~312
sB1728	B8	24.8	445~490
sJ3412I	B8	24.8	320~340
sJ1668I	B8	24.8	278~308
sB3751	B8	52.0	165~198
sB5162	B8	62.9	274~316
sB3739	B8	76.1	373~377

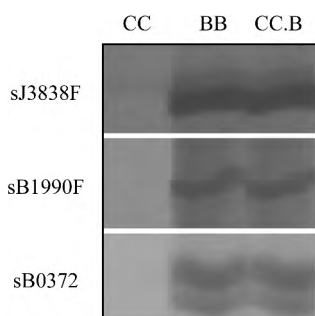


图 1 SSR 分子标记鉴定外源的黑芥染色体

注: sJ3838F, sB1990, sB0372 分别代表三个标记; CC: 甘蓝; BB: 黑芥, CC.B: 异源三倍体杂种

Figure 1 Identification of individual alien chromosomes of *B. nigra* by SSR markers

Note: sJ3838F, sB1990, and sB0372 represented three markers; CC: *B. oleracea*; BB: *B. nigra*; CC.B: The triploid hybrid

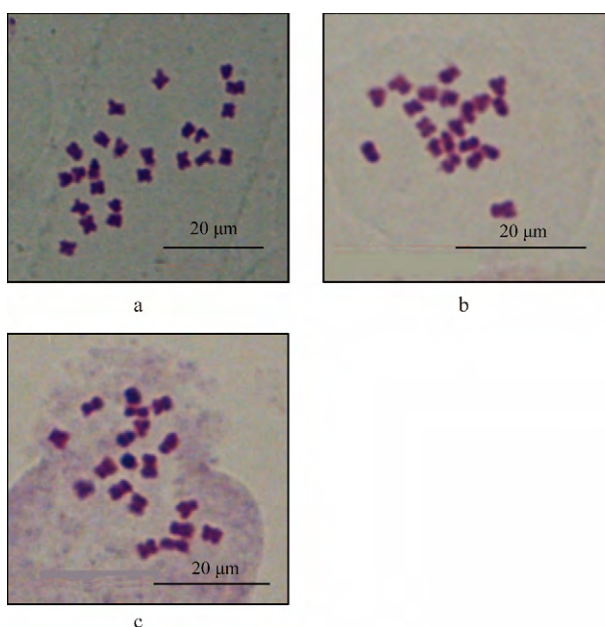


图 2 体细胞染色体数

注: a: 染色体数目为 $2n=24$; b: 染色体数目为 $2n=20$; c: 染色体数目为 $2n=19$

Figure 2 Somatic chromosome number

Note: a: The chromosome number was $2n=24$, b: The chromosome number was $2n=20$, c: The chromosome number was $2n=19$

1.3 原位杂交鉴定

对于筛选出的附加系材料进一步采用原位杂交的方法来确认其染色体的组成。为了区分甘蓝染色体与附加的黑芥染色体,以 B 基因组着丝粒的特异重复序列 pBNBH35 (Schelfhout et al., 2004)作为探针。采用原位杂交技术确认的一个甘蓝-黑芥单体异附加系材料,箭头所示的拥有一个红色信号的染色体即为附加黑芥的一条外源染色体(图 3)。

表 2 BC₁ 至 BC₃ 后代植株体细胞染色体数目

Table 2 The somatic chromosome number of the BC₁ to BC₃ progenies

世代 Generations	染色体数目 Chromosome number							合计 Sum
	2n=18	2n=19	2n=20	2n=21	2n=22	2n=23	2n=24	
BC ₁	62	14	0	3	5	2	3	89
BC ₂	38	10	6	2	1	-	-	57
	43	16	2	3	3	-	-	67
	35	7	7	9	5	2	0	65
BC ₃	37	12	5	2	0	-	-	56
	106	31	5	-	-	-	-	142
植株数目 No. of plants	91	44	2	-	-	-	-	137
	412	134	27	19	14	4	3	613

1.4 表型鉴定

获得的这些单体异附加系植株的表型整体上偏向于亲本甘蓝(CC),但不同的单体异附加系植株在生长的各个时期都表现出了明显的可识别的差异,在诸如叶形叶色、株型、生活力等方面都拥有一些明显的特征(表 3),这些表型上的差异能够直观的对各附加系进行鉴别。

1.5 单体异附加系的获得

本研究中以三倍体杂种(CC.B, 2n=3x=26)为母

表 3 各附加系的特异表型统计

Table 3 Specific phenotypes of each MAAL

附加系 MAAL	特异性表型 Specific phenotypes
CC-B1	叶片有泡状褶皱; 低温不育 Puckered leaves surface; anthers contained no pollen at low temperature
CC-B3	三角叶; 植株高大; 茎干, 幼嫩的花蕾和角果呈紫色; 角果细长 Triangular leaves; plant tall; purple color on stems, young buds and pods; slender pods
CC-B4	叶深绿有锯齿; 生长缓慢; 角果短胖; 种子较小 Dark green leaves with crenate margins; growth slowly; wide and short pods with smaller seeds
CC-B5	浅绿色略带锯齿的卵型叶片; 角果短胖; 种子大 Light green and ovate leaves with slight serrations; wide and short pods with big seeds
CC-B6	侧枝发达; 开花早 Developed lateral branches; flowered early
CC-B7	株型矮小; 叶细长; 生活力弱 Dwarf; slender leaves; weak vitality
CC-B8	叶厚实, 略带锯齿; 植株高, 分枝少; 花序似黑芥, 花蕾多; 角果长 Thicker and harder leaves with slightly crenate margins; plant tall with few branches; the inflorescences similar to those of <i>B. nigra</i> with many flower buds; long pods

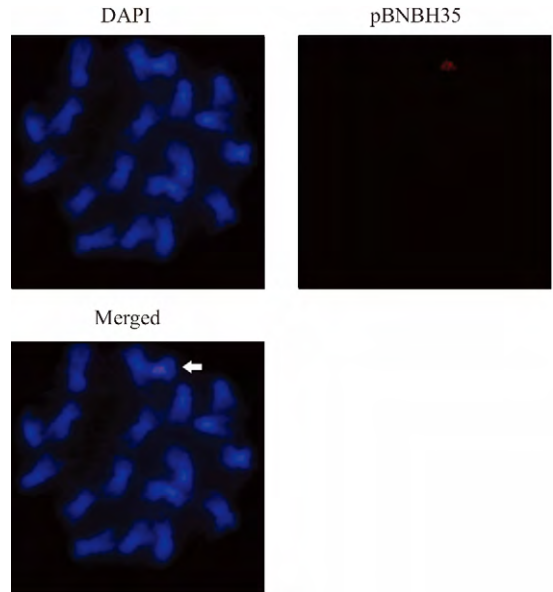


图 3 荧光原位杂交鉴定来源于黑芥的外源染色体

Figure 3 Identification of individual alien chromosomes of *B. nigra* by FISH

本,用亲本甘蓝(CC)进行连续回交。在 BC₁ 后代中总共获得了 89 个植株,其中有 14 株为单体异附加系(2n=19),经鉴定分别附加了 B1 (8 株),B4 (2 株)和 B5 (4 株)染色体,剩下的 13 株附加了 3~6 条 B 基因组染色体。然后,由 4 株 BC₁ 代植株进一步回交获得了 245 株 BC₂ 植株,发现 45 株为单体异附加系植株,经鉴定附加的染色体分别为 B1 (6 株),B3 (1 株),B4 (10 株),B5 (24 株),B7 (2 株)及 B8 (2 株),剩下的

47 个植株依然附加了多条外源染色体($2n=20\sim 22$)。由于附加 B2 和 B6 染色体的附加系还未得到,我们选取 BC₂ 后代中一个附加 B1 和 B6 的二体附加系进行进一步的回交,在得到的 137 株后代中筛选到 25 株附加 B1 的单体异附加系和 19 株附加 B6 的单体异附加系。因此,本研究获得了 7 个不同的甘蓝-黑芥单体异附加系材料,总共 134 个单株,具体如下:CC-B1 (39 株),CC-B3 (11 株),CC-B4 (12 株),CC-B5 (28 株),CC-B6 (19 株),CC-B7 (2 株)和 CC-B8 (23 株)(表 4)。而没有获得附加 B2 染色体的单体异附加系,只鉴定出还包含有另外两条染色体的、生活力很差的植株,没能产生后代。

表 4 单体异附加系的数目和分布

Table 4 The distribution and number of MAALs

附加系 MAALs	附加系数个数 Number of MAALs			总计 Total
	BC ₁	BC ₂	BC ₃	
CC-B1	8	6	25	39
CC-B2	0	0	0	0
CC-B3	0	1	10	11
CC-B4	2	10	0	12
CC-B5	4	24	0	28
CC-B6	0	0	19	19
CC-B7	0	2	0	2
CC-B8	0	2	21	23
总计 Total	14	45	75	134

2 讨论

分子标记是追踪外源染色体最快速有效的手段,而 SSR 标记由于其更加丰富的多态性和简洁的操作性在最近的附加系相关研究中被广泛采用,如 Kang 等(2014)利用 SSR 分子标记获得了全套的甘蓝型油菜附加蓝染色体的单体异附加系。Chen 等(2014)通过澳洲棉特异的 SSR 引物的鉴定获得了 11 个陆地棉-澳洲棉单体异附加系和两个多重异附加系。本研究中采用了一套被广泛证实的在芸薹属 B 基因组中均匀分布的、稳定性好的 SSR 标记(表 1)。利用这套标记,我们在苗期就能对回交后代进行基因型鉴定,从而快速有效地进行筛选,大大提高了效率,也节省了大量人力物力。本研究能够在较短的时间里(只回交了 3 代)就基本上获得了整套的甘蓝-黑芥单体异附加系,主要归功于这套 SSR 标记的高

效筛选。但是,对于附加系材料的鉴定,分子标记技术只能检测外源染色体的存在与否,却难以确定其拷贝数(单体,二体)及存在类型(附加,代换或易位),还需要借助细胞学等其他手段来弥补其不足。

细胞学技术是鉴定外源染色体的重要手段,其中染色体计数是远缘杂种鉴定的基础方法,通常是选取幼嫩的处于生长旺盛时期的组织器官进行计数;不同类型的植物染色体计数选取的组织材料不同,芸薹科植物首选幼嫩子房(Li et al., 1995)。基因组原位杂交(GISH)和荧光原位杂交(FISH)是最新的分子细胞遗传学技术,它是在染色体或细胞核上可视化定位核苷酸序列的一种非常有效的方法,该技术特异性强,灵敏度高,结果更为直观,被广泛应用到物种核型分析及外源染色体(片段)的检测。目前,利用 GISH/FISH 技术,已成功鉴定出水稻附加药用野生稻、甘蓝型油菜附加多种近缘种、陆地棉附加海岛棉等异附加系材料(Tan et al., 2005; Budahn et al., 2008; Zhao et al., 2008; Kang et al., 2014; Chen et al., 2014)。荧光原位杂交技术应用的关键是探针,在芸薹属中现已开发出了用于区分 A、B、C 三个基因组的探针,其中 Schelfhout 等(2004)发现了 1 个 329 bp 的串联重复特异定位在 B 基因组染色体着丝粒区。本研究应用近年来芸薹属中分子细胞遗传学的研究成果,采用 B 基因组特异串联重复序列标记的探针能够准确地鉴定外源 B 染色体的数目及存在形式,并印证分子标记的结果。

形态学鉴定也是重要的补充手段,外源染色体的表达会产生一些不同于受体亲本的表型特征,通过比较其中的差异,能够直观、便捷地鉴定 MAALs。例如,在甘蓝型油菜-诸葛菜 MAALs 中,根据锯齿叶、花瓣颜色和雌不育能够鉴定不同的附加系(Zhao et al., 2008; Ding et al., 2013);白菜-甘蓝 MAALs 中的花色、种皮颜色等形态学标记(Heneen et al., 2012)。形态学标记具有直观和便捷的优势,能与其他技术手段一起共同鉴定附加系材料。本研究中,附加了同一条外源 B 染色体的植株往往表现出了一致的表型特征,而不同附加系之间也表现出了明显的表型差异性,这进一步印证了我们前面对附加系材料鉴定的准确性。

在本研究中,为了获得甘蓝-黑芥单体异附加系,我们探索出了一套快速、准确地鉴定外源 B 基因组染色体的完整鉴定体系,包括表型、细胞学、荧光原位杂交和分子标记等多种手段的联合应用。在此基础上创建了一套甘蓝-黑芥几乎全套的单体异附

加系材料,具有重要的理论研究与应用价值。

3 材料与方法

3.1 实验材料

本研究所用到的材料包括两个二倍体亲本芥蓝 (*B. oleracea* var. *alboglabra* L., CC, $2n=18$, 品种: 迟芥蓝) 黑芥 (*B. nigra* (L.) Koch, BB, $2n=16$, 品种: Giebra), 及它们杂交直接产生的三倍体杂种 (CC.B, $2n=26$) (Cui et al., 2012)。三倍体杂种为母本, 以亲本甘蓝 (CC) 为父本, 连续回交 3 代, 在获得的 $BC_1\sim BC_3$ 代植株中开展对异附加系材料的筛选。

3.2 SSR 分子标记分析

本研究共用到 49 对 B 基因组特异的 SSR 引物, 其中 45 对是由 Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC) 开发的, 这些标记能够很好地区分黑芥的每一条染色体 (Navabi et al., 2010; Yang et al., 2016), 剩下的 4 对为 B 基因组其中 4 条染色体的锚定标记 (Guo et al., 2012) (表 1)。PCR 体系为 10 μ L, 包括模板 DNA 2 μ L (50 ng/ μ L), 左右引物 (10 mmol/L) 各 0.5 μ L, $10\times$ 缓冲液 1 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.2 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 0.8 μ L, *Taq* 酶 (1 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 4.8 μ L。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 9 个循环, 每个循环退火温度递减 0.5 $^{\circ}$ C, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束以后 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳或 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 (巴德仁贵等, 2015)。

3.3 普通细胞学观察

在晴朗的天气下, 取直径约 3~4 mm 的花蕾并挑出子房, 用 2 mmol/L 的 8-羟基喹啉在室温下 (约 22 $^{\circ}$ C) 暗处理 3~4 h 后转入卡诺固定液 (乙醇: 冰醋酸体积比 3:1) 中固定 24 h 以上, 于新鲜的卡诺固定液中 -20 $^{\circ}$ C 长期保存备用。取出材料于 1 mol/L HCL 中 60 $^{\circ}$ C 水浴 8 min, 蒸馏水浸泡 1 min 后捣碎, 改良卡宝品红染色液染色 30 s 左右, 用镊子轻轻敲打盖片使得细胞散开。显微镜下观察染色体计数, 每个材料至少观察三个完整的细胞。

3.4 荧光原位杂交

B 基因组着丝粒探针的标记, 使用的 B 基因组着丝粒特异重复序列 pBNBH35, 以及 PCR 分析参照 Schelfhout 等 (2004) PCR 扩增并纯化后, 利用 Invi-

trogen 公司标记试剂盒 (BioPrime DNA Labeling System) 采用随机引物法标记。荧光原位杂交步骤参照 Cui 等 (2012)。

作者贡献

谭晨是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 朱开元和向依参与实验设计, 试验结果分析, 论文初稿的写作, 李再云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

本研究由国家自然科学基金 (31371656) 资助。

参考文献

- Budahn H., Schrader O., and Peterka H., 2008, Development of a complete set of disomic rape-radish chromosome-addition lines, *Euphytica*, 162(1): 117-128
- Bade R.G., Li S., Wang S.M., Ma Y., and Hasi A.G.L., 2015, Bioinformatic analysis of VACVase-like gene from several plants, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(2): 382-391 (巴德仁贵, 李爽, 王绍萌, 马勇, 哈斯阿古拉, 2015, 几种植物类伐昔洛韦水解酶基因的生物信息学分析, *基因组学与应用生物学*, 34(2): 382-391)
- Chen Y., Wang Y., Wang K., Zhu X., Guo W., Zhang T., and Zhou B., 2014, Construction of a complete set of alien chromosome addition lines from *Gossypium australe* in *Gossypium hirsutum*: morphological, cytological, and genotypic characterization, *Theor. Appl. Genet.*, 127(5): 1105-1121
- Chèvre A.M., Barret P., Eber F., Dupuy P., Brun H., Tanguy X., and Renard M., 1997, Selection of stable *Brassica napus-B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression, *Theor. Appl. Genet.*, 95(7): 1104-1111
- Chèvre A.M., Eber F., This P., Barret P., Tanguy X., Brun H., Delseny M., and Renard M., 1996, Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus-B. nigra* addition lines, *Plant Breeding*, 115(2): 113-118
- Chèvre A.M., This P., Eber F., Deschamps M., Renard M., Delseny M., and Quiros C.F., 1991, Characterization of disomic addition lines *Brassica napus-Brassica nigra* by isozyme, fatty acid, and RFLP markers, *Theor. Appl. Genet.*, 81(1): 43-49
- Cui C., Ge X.H., Gautam M., Kang L., and Li Z.Y., 2012, Cytoplasmic and genomic effects on meiotic pairing in

- Brassica* hybrids and allotetraploids from pair crosses of three cultivated diploids, *Genetics*, 191(3):725-738
- Ding L., Zhao Z.G., Ge X.H., and Li Z.Y., 2013, Intergeneric addition and substitution of *Brassica napus* with different chromosomes from *Orychophragmus violaceus*: Phenotype and cytology, *Scientia Horticulturae*, 164: 303-309
- Guo S., Zou J., Li R., Long Y., Chen S., and Meng J., 2012, A genetic linkage map of *Brassica carinata* constructed with a doubled haploid population, *Theor. Appl. Genet.*, 125 (6): 1113-1124
- Heneen W.K., Geleta M., Brismar K., Xiong Z., Pires J.C., Hasterok R., Stoute A.I., Scott R.J., King G.J., and Kurup S., 2012, Seed colour loci, homoeology and linkage groups of the C genome chromosomes revealed in *Brassica rapa*-*B. oleracea* monosomic alien addition lines, *Ann. Bot.*, 109(7): 1227-1242
- Jahier J., Chèvre A.M., Tanguy A.M., and Eber F., 1989, Extraction of disomic addition lines of *Brassica napus*-*B. nigra*, *Genome*, 32(3): 408-413
- Kang L., Du X., Zhou Y., Zhu B., Ge X.H., and Li Z.Y., 2014, Development of a complete set of monosomic alien addition lines between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* (Chinese woad), *Plant Cell Rep.*, 33(8): 1355-1364
- Li Z., Liu H., and Luo P., 1995, Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus*, *Theor. Appl. Genet.*, 91(1): 131-136
- Navabi Z.K., Huebert T., Sharpe A.G., O'Neill C.M., Bancroft I., and Parkin I.A., 2013, Conserved microstructure of the *Brassica* B genome of *Brassica nigra* in relation to homologous regions of *Arabidopsis thaliana*, *B. rapa* and *B. oleracea*, *BMC Genomics*, 14(1): 250-253
- Navabi Z.K., Parkin I.A., Pires J.C., Xiong Z., Thiagarajah M.R., Good A.G., and Rahman M.H., 2010, Introgression of B-genome chromosomes in a doubled haploid population of *Brassica napus* × *B. carinata*, *Genome*, 53(8): 619-629
- Pradhan A., Nelson M.N., Plummer J.A., Cowling W.A., and Yan G., 2011, Characterization of *Brassica nigra* collections using simple sequence repeat markers reveals distinct groups associated with geographical location, and frequent mislabelling of species identity, *Genome*, 54(1): 50-63
- Prakash S., Bhat S.R., Quiros C.F., Kirti P.B., and Chopra V.L., 2009, *Brassica* and its close allies: cytogenetics and evolution, *Plant Breeding Reviews*, 31: 21-24
- Schelfhout C.J., Snowdon R., Cowling W.A., and Wroth J.M., 2004, A PCR based B-genome-specific marker in *Brassica* species, *Theor. Appl. Genet.*, 109(5): 917-921
- Struss D., Bellin U., and Robbelen G., 1991, Development of B-genome chromosome addition lines of *B. napus* using different interspecific *Brassica* hybrids, *Plant Breeding*, 106 (3): 209-214
- Struss D., Quiros C.F., Plieske J., and Robbelen G., 1996, Construction of *Brassica* B genome synteny groups based on chromosomes extracted from three different sources by phenotypic, isozyme and molecular markers, *Theor. Appl. Genet.*, 93(7): 1026-1032
- Struss D., Quiros C.F., and Robbelen G., 1992, Mapping of molecular markers on *Brassica* B-genome chromosomes added to *Brassica napus*, *Plant Breeding*, 108(4): 320-323
- Tan G.X., Jin H.J., Li G., He R.F., Zhu L.L., and He G.G., 2005, Production and characterization of a complete set of individual chromosome additions from *Oryza officinalis* to *Oryza sativa* using RFLP and GISH analyses, *Theor. Appl. Genet.*, 111(8): 1585-1595
- Warwick S.I., 2011, Brassicaceae in agriculture, In: Schmidt R., and Bancroft I. (eds), *Genetics and genomics of the brassicaceae*, Springer, New York, USA, pp.33-65
- Yang S., Chen S., Geng X.X., Yan G., Li Z.Y., Meng J.L., Cowling W.A., and Zhou W.J., 2016, The first genetic map of a synthesized allohexaploid *Brassica* with A, B and C genomes based on simple sequence repeat markers, *Theor. Appl. Genet.*, 129(4): 689-701
- Zhao Z.G., Hu T.T., Ge X.H., Du X.Z., Ding L., and Li Z.Y., 2008, Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* and their backcrossing progenies, *Plant Cell Rep.*, 27 (10): 1611-1621
- Zhu B., Tu Y., Zeng P., Ge X.H., and Li Z.Y., 2016, Extraction of the constituent subgenomes of the natural allopolyploid rapeseed (*Brassica napus* L.), *Genetics*, 204(3): 1015-1027