

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00206

# 甘蓝型油菜种子发芽率 QTL 定位及相关生理性状

马爱芬, 王雯, 李加纳, 谌利, 王家丰, 刘列钊

西南大学农学与生物技术学院, 重庆市油菜研究工程中心, 重庆北碚 400716

**摘要:** 利用 GH06×P<sub>174</sub> 组合衍生的 183 个重组自交系进行种子发芽率遗传分析及种子发芽期间种子生理性状分析。用复合区间作图法对在室温下保存两年的种子(STY)、保存 1 年的种子(SOY)与新收获种子(FS)发芽率进行 QTL 定位。另外对保存两年的种子及新收获的种子萌发期间脂肪酶活性、电导率、还原糖含量、总糖含量及根系活力进行了测定, 并对结果进行分析。结果表明 3 批种子的发芽率 QTL 位点各不相同, 保存两年的种子在第 9、14、17 条连锁群上分别检测到 1 个位点, 保存 1 年的种子在第 5、9 条连锁群上各检测到 1 个位点, 新收获的种子在第 4、18 条连锁群上分别检测到 1 个位点。研究发现, 3 批种子的发芽率相关性不显著, 发芽率差异达到极显著水平, 同时保存不同年份种子的发芽率 QTL 各不相同, 这表明甘蓝型油菜发芽率受很多不同因素所控制。保存两年及新收获种子的发芽率与电导率之间的相关性均达到极显著负相关, 表明可以通过电导率的测定估测发芽率, 电导率的研究对种子发芽率的研究具有重要意义。

**关键词:** 甘蓝型油菜; 数量性状基因座(QTL); 发芽率; 生理性状

## QTL for seed germination rate and related physiological traits of *Brassica napus* L.

MA Ai-Fen, WANG Wen, LI Jia-Na, CHEN Li, WANG Jia-Feng, LIU Lie-Zhao

Chongqing Engineering Research Center for Rapeseed, College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Beibei 400716, China

**Abstract:** One hundred and eighty-three recombinant inbred lines from the cross between GH06 and P<sub>174</sub> were used for genetic analysis of seed germination rate and physiological trait analysis of *Brassica napus* L. Composite interval mapping (CIM) was applied to identify QTL associated with seed germination rate (GR) of the seeds that stored for two years (STY), one year (SOY), and fresh seeds (FS), respectively. The activity of lipases, seed conductivity, reducing sugar content, total sugar content, and root vitality of STY and FS were investigated. The QTL for seed GR of various stored seeds were different. Three QTLs for STY were detected on the linkage group (LG) 9, 14, and 17. Two QTL for SOY were mined on LG 5 and 9. Two QTLs for FS were detected on LG 4 and 18. The germination rate of seeds from three years was significantly different, and the QTL of GR was not identical, which indicated that the seed germination was controlled by many loci. Furthermore, the seed germination rate was negatively correlated with seed conductivity, which means that measurement of seed conductivity can be used to estimate GR, and the study of conductivity is important for GR research.

**Keywords:** *Brassica napus* L.; quantitative trait locus (QTLs); germination rate (GR); physiological traits

收稿日期: 2008-04-24; 修回日期: 2008-09-26

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(编号: 2006CB101604), 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z1E6)资助

作者简介: 马爱芬(1980-), 女, 硕士, 研究方向: 植物分子育种。E-mail: mafeifei3@163.com

通讯作者: 刘列钊(1973-), 男, 副教授, 研究方向: 作物遗传育种。Tel: 023-68250701; E-mail: liezhao2003@126.com

种子发芽率是一个重要农业生产指标,也是一个重要的育种目标。对发芽率的研究,国内外有如番茄<sup>[1]</sup>、十字花科的白菜<sup>[2]</sup>及拟南芥<sup>[3]</sup>等关于环境因素对发芽率的影响、发芽率与其他生理指标的关系等相关报道,但对发芽率 QTL 研究的报道相对较少,仅在水稻<sup>[4]</sup>有过 QTL 遗传研究报道。目前对甘蓝型油菜发芽率的研究主要是发芽条件,发芽生理,老化机理等方面的工作。董遵等<sup>[5]</sup>对甘蓝型油菜黄、褐籽发芽率及相关性状进行了比较,徐剑等<sup>[6]</sup>利用不同离子束的不同剂量对油菜品系辐射,研究了其油菜种子芽势、发芽率和出苗成活率的影响。蒋海玉等<sup>[7]</sup>对提出了可以通过种子培养方法能有效提高贮藏种质的发芽率。

发芽率是一个很复杂的数量性状,发芽率高低受种子的结构、收获期、贮藏期的影响,且可能受多个基因的控制。本研究通过对收获后保存两年、保存一年与新收获种子发芽率进行测定,并根据利用 SSR、AFLP、SRAP 及 TRAP 标记构建的遗传连锁图谱,对影响种子发芽率的 QTL 进行分析。其次对保存两年种子和新收获种子发芽率表现极端的材料的种子在发芽时期脂肪酶活性、电导率、还原糖含量、总糖含量及根系活力生理性状进行分析,以期对甘蓝型油菜发芽时期种子生理性状的变化、各性状间的关系及这些生理性状对发芽率的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

研究材料是由 183 个重组自交系(Recombinant inbred lines, RILs)组成的群体,他们是亲本 GH<sub>06</sub>×P<sub>174</sub> 杂交通过单粒传自交获得,分别于 2005、2006、2007 年收获的 F<sub>2:6</sub>、F<sub>2:7</sub> 及 F<sub>2:8</sub>。黑籽亲本 P<sub>174</sub> 为双低品系油研 2 号的定向自交选择后代,该亲本的平均发芽率为 98.7%,黄籽亲本 GH<sub>06</sub> 为甘蓝型黄籽油菜 GH<sub>01</sub>×甘蓝型黄籽油菜 GH<sub>03</sub> 的自交高世代,该亲本的平均发芽率为 96.2%。随机区组设计,3 行区,每行 10 株,行距 0.4 m,行长 2.4 m,株距 0.24 m,3 个重复。大田管理与生产管理相同,按单株分别收获。研究所用种子是在室温 20~25℃,空气相对湿度为 65% 的黑暗条件下贮藏。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 发芽率测定

每株系随机取 100 粒天然种子,用 75% 酒精消毒 10 min,蒸馏水冲洗干净,排列于铺有两层滤纸的 9 cm 培养皿内,25℃ 生化培养箱中湿润培养,每天光照 12 h,7 d 统计发芽率。

#### 1.2.2 脂肪酶活力测定

研究中,对保存两年种子分别取 10 个发芽率高的和 10 个发芽率低的材料,及与其相对应的新收获的种子对其种子发芽期间生理性状进行测定。

将油菜种子浸泡 24 h,称取两份 1 g 左右的种子。用 1 mL 0.1 mol/L、pH 5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液匀浆后,用 1 mL 蒸馏水冲洗研钵两次,转移至 10 mL 离心管中,分别加 0.2 mL 菜籽油后在摇床上振荡 1 min。取其中一支放在沸水浴中加热 5 min 作为空白,另两管分别加一滴甲苯,在 37℃ 的温箱中保温 2 h。保温结束后,向 3 个管中分别加入 5 mL 4:1 的乙醇-丙酮混合液,8 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移入三角瓶中,加入一滴酚酞,用 0.1 mol/L 的 NaOH 滴定至微红色,记录 NaOH 用量,并计算脂肪酶的活力(mL/g)。

#### 1.2.3 电导率的测定

将油菜种子浸泡在无离子的纯水中,24 h 后,用 DST-A 型电导仪测定外渗液的电导率(ms),设置 3 个重复,测定出的数据计算平均值。

#### 1.2.4 种子还原糖与总糖含量的测定

用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定甘蓝型油菜种子中的还原糖、总糖含量<sup>[8-10]</sup>。

#### 1.2.5 种子的根系活力测定

取新鲜幼根 1 g 左右,用氯化三苯基四氮唑(TTC)法<sup>[11]</sup>进行根系活力测定,将根浸没在含 0.2% TTC 的 0.0335 mol/L 磷酸缓冲液中,置于黑暗条件下 37℃ 保温 3 h,加入 1 mol/L 的硫酸以终止反应。然后加乙酸乙酯及少量石英砂一起研磨,用乙酸乙酯反复提取红色的 TTCH,提取液用蒸馏水定容至 25 mL。测定 485 nm 波长下提取液的光密度。根据标准曲求出 TTC 还原量。根系活力用单位时间

内单位鲜根还原的 TTC 的量 $[\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})]$ 表示。

#### 1.2.6 SRAP、SSR、AFLP 及 TRAP 分子标记分析

每株系随机取 10 个单株的幼嫩叶片混合样 1 g。采用改进的 CTAB 法<sup>[12]</sup>提取基因组 DNA。SRAP 标记根据 Li 和 Quiros<sup>[13]</sup>的方法设计引物序列, 扩增体系和程序主要参考文雁成等<sup>[14]</sup>的方法。AFLP 接头和扩增引物参照 Vos 等<sup>[15]</sup>, 扩增体系和程序主要参考 Zhao 等<sup>[16]</sup>提供的方法。SSR 引物序列按照 <http://www.uk.crop.net> 网站上的序列进行合成, 反应参照 Saal 等<sup>[17]</sup>方法。根据 1,5-2-磷酸核酮糖羧化酶(RuBPc)、脂肪酸延长酶(FAE1)及脂肪酸去饱和酶(FAD2)3 个基因 EST 序列设计 TRAP 正反向特异引物, 扩增时正反向特异引物分别与 SRAP 中的反向和正向引物进行组合, 扩增体系和程序参考 Hu 等<sup>[18]</sup>提供的方法。

SRAP 扩增位点的命名方式为: EMx /MEyz; SSR 扩增位点命名为: 甘蓝型油菜引物 Nax-z, 甘蓝引物 Olx-z, 白菜引物 Rax-z; AFLP 扩增位点命名方式为: ExMyz; TRAP 标记扩增位点的命名参考 SRAP 标记, 换相应正反向特异引物进行组合。其中 x、y 为引物编号, z 为按扩增片段由大到小排号 a, b, c。

#### 1.2.7 遗传连锁图谱及发芽率 QTL 定位

利用 JoinMap3.0 软件构建连锁图谱, 将 LOD 值最小设为“3.0”, 作图时根据连锁群实际情况增大 LOD 值。我们从  $F_{2:6}$  代开始对群体进行连锁图谱的建立, 后两年逐渐进行完善。

利用软件 Windows QTL Cartographer V2.5 对发芽率进行 QTL 分析。在概率值  $P = 0.01$  的条件下, 进行 1 000 次排序测验(Permutation test), 获得不同性状的显著性似然比统计阈值(LRS threshold)作为显著 QTL 存在的标准<sup>[19]</sup>, 对种子发芽率进行全基因组扫描, 在连锁群上每隔 1 cM 进行一次 QTL 是否存在的可能性检测, 确定发芽率 QTL 的数目及在连锁群上的位置。运行软件的结果可同时给出 QTL 的加性效应和对相关性状的表型贡献率。

## 2 结果与分析

### 2.1 发芽率

从图 1 中可以看出, 保存了两年的种子发芽率

开始发生下降, 发芽率的概率呈正态分布。保存一年的种子与新鲜种子的发芽率呈偏态分布, 发芽率绝大部分能够达到 97% 以上。经相关性分析发现 3 批种子发芽率的相关性不显著, 结合图 1 说明种子随着贮藏时间的变化而变化, 但变化的水平不一致, 即种子的生命力不尽相同。

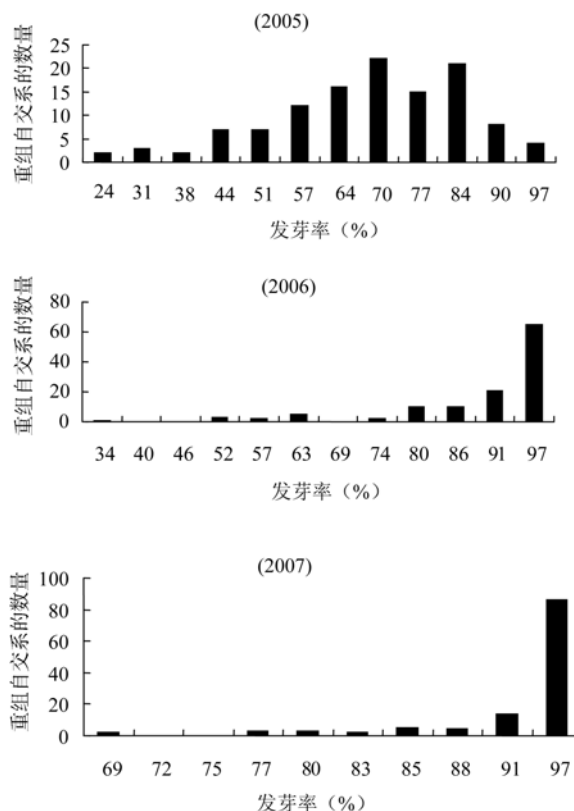


图 1 2005、2006、2007 年收获种子的发芽率概率分布情况

### 2.2 生理性状的 analysis

对保存了两年及新收获的两批种子之间分别对其发芽期的生理性状进行方差分析(表 1), 两批种子的电导率差异达到极显著。而脂肪酶活力和还原糖含量的差异不显著。保存两年、保存一年及新收获 3 批种子的发芽率、根系活力和总糖含量差异达到极显著。从图 2 中可以发现种子的发芽率、脂肪酶活力及还原糖含量的均值随种子贮存的时间长短变化不大。而总糖含量、电导率及根系活力随贮存时间的延长而急剧降低。

表 1 发芽期间种子的部分性状方差分析结果

生理性状	变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
发芽率	环境	0.8526	1	0.8526	18.7730	0.0001
	误差	1.7259	38	0.0454		
	总和	2.5785	39			
脂肪酶活性	环境	0.0081	1	0.0081	0.0050	0.9417
	误差	56.8897	38	1.4971		
	总和	56.8978	39			
电导率	环境	1.5054	1	1.5054	20.9350	0.0001
	误差	2.7326	38	0.0719		
	总和	4.2380	39			
还原糖含量	环境	0.0001	1	0.0001	0.3090	0.5815
	误差	0.0135	38	0.0004		
	总和	0.0136	39			
总糖含量	环境	0.0250	1	0.0250	129.5340	0.0001
	误差	0.0073	38	0.0002		
	总和	0.0323	39			
根系活力	环境	3.0526	1	3.0526	18.2470	0.0001
	误差	6.3570	38	0.1673		
	总和	9.4096	39			

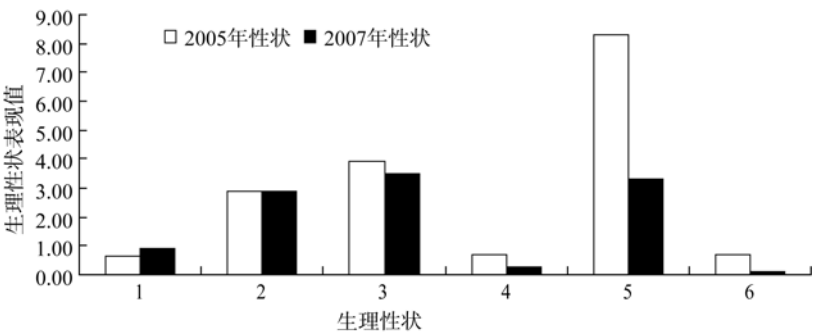


图 2 2005 年及 2007 年群体部分材料种子发芽率及发芽期间部分生理性状平均值表现  
1: 发芽率; 2: 脂肪酶活力(mL/g); 3: 还原糖含量(%); 4: 电导率(ms); 5: 总糖含量(%); 6: 根系活力(mg/g/h)。

对保存了两年的种子在发芽期的生理性状进行相关性分析(表 2), 得到除发芽率与还原糖含量, 脂肪酶活力与总糖含量相关性不显著外, 其他性状之间的正相关及负相关水平都达到显著或极显著。对新收获的种子在发芽期时各性状的相关性进行分析(表 3), 发现除发芽率与电导率呈极显著负相关, 还原糖含量与总糖含量呈显著相关水平外, 其他各性状之间的相关性不显著。

2.3 连锁图谱及 QTL 定位结果

利用软件 JoinMap3.0 对 621 个标记位点(261 个

SRAP, 181 个 SSR, 170 个 AFLP 标记和 9 个 TRAP 标记)进行遗传连锁分析(图 3), 构建的遗传连锁图包括 502 个标记位点, 27 个连锁群。遗传连锁图包括 220 个 SRAP 标记, 155 个 SSR 标记, 123 个 AFLP 标记和 4 个 TRAP 标记, 连锁群长度范围在 11~126 cM 之间, 标记数目 3~90 个之间, 标记间的平均距离为 3.38 cM, 覆盖 1 698 cM, 约占甘蓝型油菜基因组的 67.92%。

根据所构建的图谱, 利用复合区间作图法对 3 个年份的发芽率进行 QTL 分析(表 4), 3 个年份的种

子共检测到 7 个发芽率 QTL。检测到保存两年种子的发芽率 QTL 共 3 个, 命名为 *q05G-9-1*、*q05G-14-2*、*q05G-17-3*, 分别位于第 9、14、17 连锁群上, 分别解释表型变异 5.7%、7.18%、14.09%, *LOD* 值为 2.64、3.31、5.19。2006 年种子共检测到发芽率 QTL 2 个, 命名为 *q06G-5-1*、*q06G-9-2*, 分别位于第 5 与 9 条连锁群上, 分别解释表型变异

10.27% 与 9.20%, *LOD* 值为 3.67、3.00。2007 年种子共检测到发芽率 QTL 2 个, 命名为 *q07G-4-1*、*q07G-18-2*, 分别位于第 4 与 18 条连锁群, 解释表型变异 10.19% 与 8.35%, *LOD* 值为 4.5、3.05。*q05G-14-2* 的加性效应为负, 表明提高发芽率的等位基因来自于 P174, 其他 6 个 QTL 的加性效应值均为正, 表明提高发芽率的等位基因来自于 GH06。

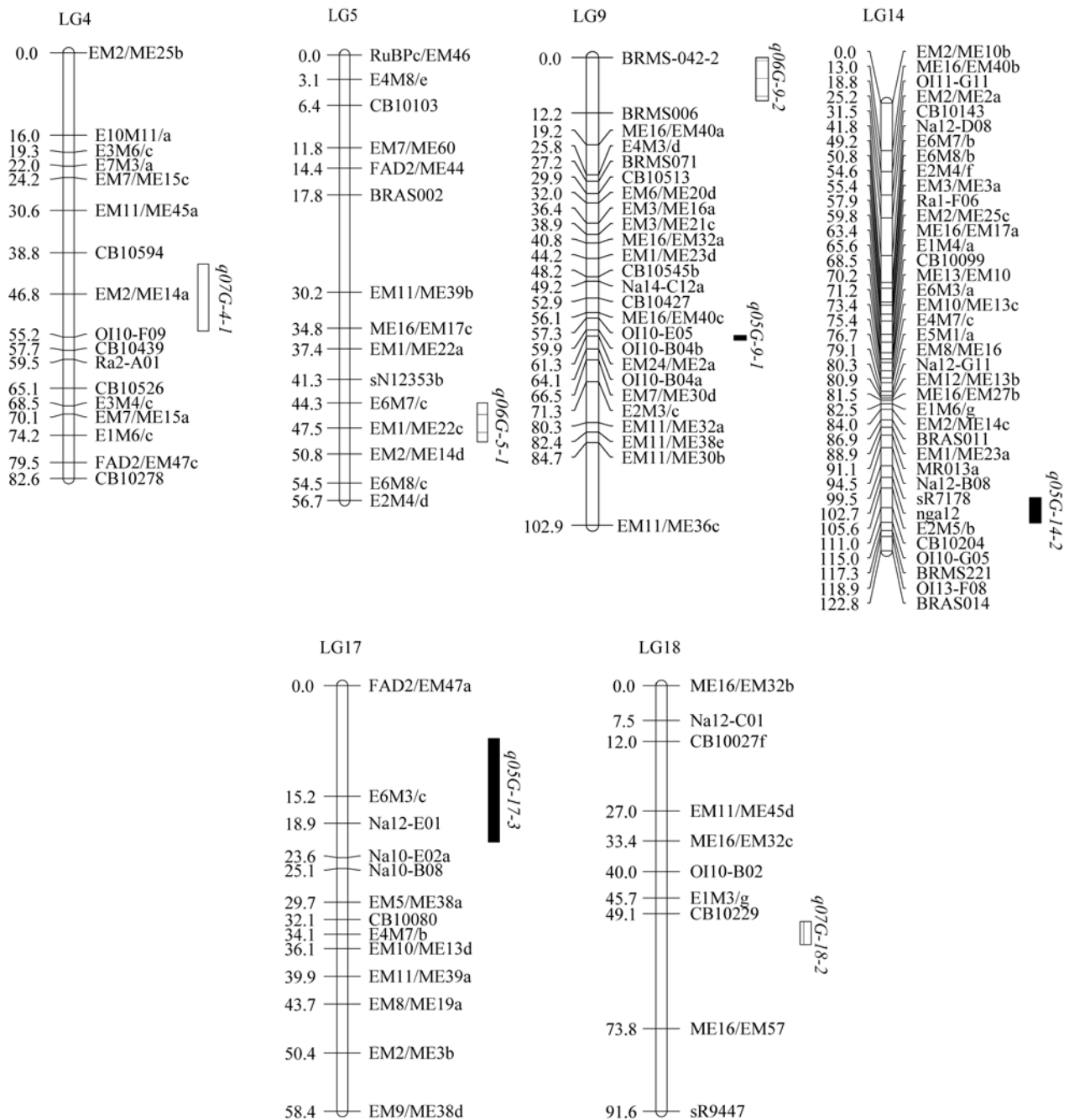


图 3 甘蓝型油菜发芽率的 QTL 在遗传图谱上的分布情况

表 2 2005 年种子在发芽期各性状的相关性

性状	发芽率	脂肪酶活力	电导率	还原糖含量	总糖含量
脂肪酶活力	-0.491*				
电导率	-0.801**	0.482*			
还原糖含量	0.439	-0.640**	-0.705**		
总糖含量	0.472*	-0.322	-0.606**	0.633**	
根系活力	-0.578**	0.472*	0.600**	-0.523*	-0.679**

\*, \*\*: 差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

表 3 2007 年种子在发芽期各性状的相关性

性状	发芽率	脂肪酶活力	电导率	还原糖含量	总糖含量
脂肪酶活力	0.203				
电导率	-0.685**	0.194			
还原糖含量	-0.118	0.011	0.095		
总糖含量	-0.074	0.330	0.149	0.640**	
根系活力	-0.088	-0.226	-0.162	0.342	-0.127

\*, \*\*: 差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。

表 4 甘蓝型油菜发芽率的 QTL 分析

种子的收获年份	QTL 标记	连锁群	位置	LOD 值	QTL 加性效应	表型变异(%)
2005 年发芽率	<i>q05G-9-1</i>	LG9	61.35	2.64	0.0424	5.70
	<i>q05G-14-2</i>	LG14	111.00	3.31	-0.0493	7.18
	<i>q05G-17-3</i>	LG17	17.16	5.19	0.0699	14.09
2006 年发芽率	<i>q06G-5-1</i>	LG5	46.33	3.67	0.0425	10.27
	<i>q06G-9-2</i>	LG9	4.01	3.00	0.0393	9.20
2007 年发芽率	<i>q07G-4-1</i>	LG4	46.83	4.5	0.0228	10.19
	<i>q07G-18-2</i>	LG18	45.69	3.05	0.0207	8.35

3 讨论

非休眠种子在正常范围的自然环境条件下, 由于其遗传因素都能够发芽<sup>[20]</sup>。发芽率反映一批种子的发芽能力, 发芽率的高低与环境, 遗传因素有很大关系。因为尚未有甘蓝型油菜发芽率 QTL 研究报道, 故本研究的结果无法与公开发表的 QTL 比较。本文以保存两年、保存一年和新收获种子为研究对象, 对 3 批种子的发芽率进行 QTL 研究, 发现其 QTL 位点各不相同, 表明对种子发芽率影响的因素很多。在第 9 连锁群上有两个 QTL 位点, 但它们之间的距离较远。保存两年的种子发芽率 QTL 总贡献率为 26.97%, 其中贡献率大于 10% 的有一个。保存一年的种子发芽率 QTL 有两个, 总贡献率为 19.47%, 其中贡献率大于 10% 的有一个, 新收获的种子发芽率

QTL 有两个, 总贡献率为 18.54%, 其中贡献率大于 10% 的有一个。从加性效应值可以看出, 与发芽率有关的 7 个 QTLS 中, 除 *q05G-14-2* 以外, 其他 6 个对发芽率起正向调节作用的等位基因均来自 GH06, 这在一定程度上可能是由于黄籽油菜因种皮薄而具有高发芽率的可能。

3 批种子的发芽率差异达极显著水平, 保存两年的种子发芽率达到 90% 以上的有 10.0%, 保存一年的种子发芽率达到 90% 以上的有 72.2%, 新收获的种子发芽率达到 90% 以上的有 84.0%。同时相关性分析发现, 3 批种子的发芽率无相关性。综上表明, 种子的发芽率与贮藏时间有很大关系, 随着贮藏时间的延长, 部分种子的发芽率会有下降的现象, 各株系间种子的发芽率下降趋势不同。

两批种子在发芽期间部分生理性状的相关分析



发现,发芽率与电导率呈极负相关,表明可以通过电导率的测定来预测种子的发芽率。保存两年的种子除发芽率与还原糖含量、脂肪酶活力与总糖含量相关性不显著外,其他各生理性状之间的相关性均达到显著或极显著水平。新收获种子的还原糖含量与总糖含量呈极显著相关,其它生理性状间的相关性不显著。这表明发芽期种子的生理性状相关性与贮藏时间有关。无论新、陈种子,其还原糖含量与总糖含量呈极显著正相关。

方差分析结果表明,2005 年和 2007 年两批种子除脂肪酶、还原糖含量表现差异不显著,其他生理性状表现极显著差异,进一步说明种子发芽是一个复杂的、综合的生理现象,该研究结果可为今后发芽率研究提供参考。今后的研究重点应在此基础上对群体材料进行分析,寻找陈种子具有不同发芽率的基因型,进一步对其进行遗传研究和相关生理性状分析。

#### 参考文献(References):

- [1] Foolad MR, Lin GY, Chen FQ. Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breed*, 1999, 18(2): 167-173. [\[DOI\]](#)
- [2] Bettley M, Finch-Savage WE, King GJ, Lynn JR. Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea*. *New Phytol*, 2000, 148(2): 277-286. [\[DOI\]](#)
- [3] Krishnasamy V, Seshu DV. Seed germination rate and associated characters in rice. *Crop Sci*, 1989, 29: 904-908.
- [4] Clerkx EJM, El-Lithy ME, Vierling E, Ruys GJ, Blankes-tijn-De Vries H, Groot SPC, Vreugdenhil D, Koornneef M. Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions *Landsberg erecta* and *Shakdara*, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiol*, 2004, 135(5): 432-443. [\[DOI\]](#)
- [5] 董遵, 张建栋, 马红梅, 许才康, 孙华. 甘蓝型油菜黄籽与褐籽发芽率及相关性状的比较. *浙江农业科学*, 2000, 6: 278-280.
- [6] 徐剑, 程国旺, 顾大勇. 离子束诱变对油菜发芽势、发芽率及出苗成活率的影响. *安徽农业科学*, 2007, 35(6): 1621-1622.
- [7] 蒋海玉, 杜燕, 刘其宁. 通过种子培养方法提高油菜贮藏种质发芽率及成苗率. *内蒙古农业大学学报*, 2001, 22(3): 48-51.
- [8] 宋占午, 王莱, 刘艳玲, 郭江暖. 3, 5-二硝基水杨酸测定还原糖含量的条件探讨. *西北师范大学学报(自然科学版)*, 1997, 33(2): 52-55.
- [9] 胡锡阶, 肖建辉, 肖瑜, 万卫红, 刘金伟, 陈代雄, 梁宗琦. 3, 5-二硝基水杨酸比色法定糖的条件优化. *遵义医学院学报*, 2005, 28(1): 9-11.
- [10] 齐香君, 苟金霞, 韩戎珺, 闫博. 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究. *纤维素科学与技术*, 2004, 12(3): 17-19.
- [11] 张宪政. 作物生理研究法. 北京: 农业出版社, 1992. 136-143.
- [12] Murry HG, Thompspon WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19): 4321-4322. [\[DOI\]](#)
- [13] Li G, Quiros CF. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2-3): 455-461. [\[DOI\]](#)
- [14] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 刘贵华, 张书芬. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 246-56.
- [15] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Pelemen J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414. [\[DOI\]](#)
- [16] Zhao JW, Meng JL. Genetic analysis of loci associated with partial resistance to sclerotium in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 2003, 106(4): 759-764.
- [17] Saal B, Plieske J, Hu J, Quiros CF, Struss D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. II. Assignment of rapeseed microsatellite to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L. *Theor Appl Genet*, 2001, 102(5): 695-699. [\[DOI\]](#)
- [18] Hu JG, Vick BA. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol Biol Rep*, 2003, 21(3): 289-294.
- [19] Churchill GA, Doerge RW. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 1994, 138(3): 963-971. [\[DOI\]](#)
- [20] Baskin CC, Baskin JM. Seeds-Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1998.