生物多样性　第 6 卷,第 1 期,1998 年 2 月
CHINESE BIODIVERSITY　6 (1) :6～12 , February , 1998

乙酰乳酸合成酶基因在芸苔属栽培种内的遗传变异①

李汝刚
(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京　100081)
James R. McFerson
(USDA-ARS , Plant Genetic Resources Unit , Cornell University , USA)
Stephen Kresovich
(USDA-ARS , Plant Genetic Resources Conservation Unit , University of Georgia , USA)

摘　要　利用乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase ,ALS)基因开发抗除草剂的转基因植物引起了植物分子生物学家的广泛兴趣。了解农业上重要物种中 ALS 基因的结构、组织、功能及其遗传变异是十分必要的。在芸苔属植物中,ALS 基因以多基因家族的形式存在。本研究采用 PCR 技术试图:1) 揭示 ALS 基因在芸苔属 3 个栽培种(*Brassica rapa*, *B. oleracea* 和 *B. napus*)间的遗传变异;2) 确定在种、亚种和品种 3 个水平上 ALS 基因变异的分布; 3) 评价利用由 ALS 基因产生的遗传标记区分 *B. napus* 品种的可行性。研究表明,ALS 基因在芸苔属亚种间和品种间存在广泛的遗传变异,但遗传变异的程度在不同的种内各有不同;在亚种水平上, *B. oleracea* 种内的遗传变异比 *B. napus* 种内的遗传变异低, 但比 *B. rapa* 种内的遗传变异高;在 *B. napus* 品种间发现了相当大的遗传变异,表明 ALS 基因可用于区分 *B. napus* 的品种。

关键词　芸苔属,乙酰乳酸合成酶,遗传变异

Genetic variation of acetolactate synthase gene among cultivated brassica **species/ LI Ru-Gang [1], James R. McFerson[2] , Stephen Kresovich[3]**

Abstract　The importance of utilizing acetolactate synthase (ALS) gene to create herbicide-resistant plant attracted the interest of plant molecular biologists. Understanding the structure , organization , function and the variation of ALS gene in agronomically important species is essential to transfer the resistance. ALS gene was demonstrated to be multigene family among *Brassica* species. The objectives of this study are (1) to reveal variation of ALS gene among cultivated *B. rapa*, *B. oleracea*, and *B. napus*; (2) to determine how variation for ALS gene is distributed at the species , subspecies and accessions level ; (3) to evaluate the feasibility of utilizing genetic marker from ALS gene family to discriminate accessions of *B. napus*. Polymerase chain reaction (PCR) was employed to reach the three objectives. Extensive variation for ALS gene family exists among *Brassica* subspecies and accessions. The degree of genetic variation differed within different species. At the subspecies level , variation within *B. oleracea* was lower than that within *B. napus*, but higher than that within *B. rapa*. Significant variation was found among accessions of *B. napus* indicating that the ALS gene family may be used to discriminate among individual accessions.

Key words　*brassica* ,acetolactate synthase ,variation

Author's address　1) Biotechnology Research Center , the Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081
2) USDA-ARS , Plant Genetic Resources Unit , Cornell University , Geneva , NY 14456 - 0462 , USA
3) USDA-ARS , Plant Genetic Resources Conservation Unit , University of Georgia ,

① **收稿日期**:1996 - 09 - 24 ;**接受日期**:1997 - 08 - 20

Griffin, GA 30223 - 1797, USA

乙酰乳酸合成酶(EC 4.1.3.18)代谢分支氨基酸(缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸)是生物合成途径中的第一步酶反应。ALS基因及其编码的蛋白首先在大肠杆菌(*Escherichiacoli*)中发现[1~6]。*E. coli* 中的 ALS 酶是一四聚体,由 2 个大亚基和 2 个小亚基组成,大亚基的分子量大约为 60 KDa,小亚基的分子量约为 10～20 KDa[7~9]。在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,只存在 1 个有功能的 ALS 基因[10],ALS 的小亚基尚未发现。生物化学和遗传学研究均表明,ALS 是几类除草剂(咪唑 imidazolinones、磺酰脲类 sulfonylureas 和三唑嘧啶 triazolopyrimidines)的作用位点[11,12]。1987 年以来,从几种植物中鉴定出了 ALS 基因。在拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)中发现的几类突变体能抗除草剂 sulfonylurea 和 chlorsulfuron[13,14]。为了向其他植物转移对除草剂的抗性,有必要了解农业上重要的植物中 ALS 基因的结构、组织和功能,尤其需要了解 ALS 基因在这些植物中的遗传变异。

以酵母的 ALS 基因作探针,首先从拟南芥菜和烟草的基因组文库中克隆获得了 ALS 基因[15]。经比较发现,烟草和拟南芥菜的 ALS 基因大约有 75 %的相似性,编码的成熟蛋白的相似性达 85 %,而在蛋白 N 端引导蛋白向叶绿体转移的信号肽间同源性则很低。2 个 ALS 基因均无内含子,在拟南芥菜中有 1 个拷贝,在烟草中有 2 个拷贝[15]。烟草的 2 个 ALS 基因拷贝分别来自其祖先 *N. sylvetris* 和 *N. tomentosiformis*[14]。用拟南芥菜的 ALS 基因作探针,通过 Southern 杂交初步分析 *B. napus* 种内的 ALS 基因,发现在 *B. napus* 中有 1 个以上的 ALS 基因[16]。类似的结论被 Wiersma 等人所证实[17],他们用已克隆的芸苔属 ALS 基因组克隆子作探针,通过 Southern 分析发现 *B. napus* 基因组内可能含有 4 个或更多个 ALS 基因。Rutledge 等人通过控制 Southern 杂交条件,发现在 *B. napus* 基因组内存在 5 个 ALS 基因拷贝 (ALS 1～5)[18],他们的研究表明芸苔属植物中 ALS 基因以多基因家族的形式存在,其多样性超过烟草和拟南芥菜中的 ALS 基因。DNA 序列分析表明 ALS 1 和 ALS 3 享有广泛的同源性,他们可能编码植物生长和发育所必须的 ALS 酶。ALS 2 与 ALS 1 和 ALS 3 在 DNA 序列上差异较大,并在成熟蛋白编码区、N 端叶绿体转运肽的编码区及基因上游非编码区具有独特的特征,表明 ALS 2 酶可能具有不同的功能。ALS 4 和 ALS 5 的编码区被打断,可能是缺失的 ALS 基因。分析 *B. napus* 的二倍体祖先 *B. rapa* 和 *B. oleracea* 表明,ALS 2、ALS 3 和 ALS 4 起源于 *B. rapa*,而 ALS 1 和 ALS 5 起源于 *B. oleracea*。Rutledge 等人认为每 1 个 ALS 基因家族的遗传复杂性比我们的预料要大的多[18]。

本研究目标在于:1)揭示 ALS 基因在芸苔属 3 个栽培种(*B. rapa*, *B. oleracea*,和 *B. napus*)间的遗传变异;2)确定在种、亚种和品种 3 个水平上 ALS 基因变异的分布; 3)评价利用由 ALS 基因产生的遗传标记区分 *B. napus* 品种的可行性。

1　材料与方法

1.1　供试材料

本实验使用的植物材料为芸苔属 3 个栽培种的 21 个亚种 33 个品种(见表 1)。将种子种植于温室无菌土中,当植株长出4～5片叶片时,采集叶片置于液氮中,然后转移至 -70 ℃,分批冷冻干燥。

1.2　基因组 DNA 提取

参考 Colosi 和 Schaal 的方法[19],称取 0.1 g 冷冻干燥的叶片,用直径 4 mm 的钢珠,在液氮冷冻条件下打碎组织。DNA 的提取参考 Hillis 的方法[20],用 CTAB 缓冲液提取,提取好的 DNA 溶于 100 μl TE 缓冲液(pH 8.0),用分光光度计确定 DNA 浓度。

表1 实验中使用的植物材料

Table 1 Plant materials used in the experiment

种 Species	亚种 Subspecies	品种 Cultivar	来源 Origin
甘蓝型油菜 *B. napus*	*oleifera*	Cascade	美国 USA
		Westar	加拿大 Canada
		Tobin	美国 USA
		Span	加拿大 Canada
		Per	加拿大 Canada
		Bronowski	波兰 Poland
		Glacier	加拿大 Canada
	rapifera	Laurentian	加拿大 Canada
甘蓝 *B. oleracea*	*oleracea*	野生种 Wild species	
	alboglabra	Bhug-gana	泰国 Thailand
	botrytis	All the year round	英国 England
		Cantanese	意大利 Italy
	capitata	Wisconsin Golden Acre	美国 USA
		Golden Arce Yellow Re	美国 USA
		Jersey Wakefield	美国 USA
		Gotogon Local	伊朗 Iran
		Blood Red Early	法国 France
	costata	Couve Nabica	葡萄牙 Portugal
	gemmifera	Long Island Improved Catskill	美国 USA
	gongylodes	Early White Vienna	美国 USA
	italica	Texas 107	美国 USA
		Broccolette Neri E Cespuglio	意大利 Italy
	medullosa	Giganta	法国 France
	ramosa	New Zealand Thousand Head (seed from 1990)	新西兰 NZL
		New Zealand Thousand Head (seed from 1992)	新西兰 NZL
	sabauda	Reed W	美国 USA
	sabellica	Vates	美国 USA
	selenesia	Westland Winter	荷兰 Netherlands
白菜 *B. rapa*	*chinensis*	四月慢 Si Yue Man	中国 China
	dichotoma	TL-15	印度 India
	pekinensis	卷黄叶 Curled Yellow Leaf	中国 China
	rapifera	黄蔓茎 Huang Man Jing	中国 China
	trilocularis	T-151	印度 India
	utilis	60 天 60 Day	中国 China

1.3 PCR 扩增

扩增 ALS 基因使用的引物由美国 Operon Technologies 公司根据 ALS 1 和 ALS 3 基因的序列合成[18]。引物 A 1、A 3b、B 1、B 2b、B 3b、B 5b、B 6b 来自 ALS 1 基因序列,引物的相对位置见图 1,引物 A 8 位于 ALS 3 基因的起始密码子(ATG)上游 - 202 ～ - 182 处,每一个引物 20 个碱基对长(表 2)。PCR 扩增按常规方法进行[21]。为使扩增达到必要的重复性和可靠性,本实验对常规的扩增程序进行了若干调整。反应总体积为 25μl,含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dATP, 0.2 mmol/L dCTP, 0.2 mmol/L dGTP, 0.2 mmol/L dTTP (美国 Phamacia LKB Biotechnology 公司); 0.4 μmol/L 引物; 大约 25 ng 基因组 DNA 和 0.625 单位 *Taq*DNA 聚合酶(美国 Perkin Elmer Cetus 公司); 用 Model 9600 DNA扩增仪(美国 Perkin Elmer Cetus,公司)扩增。反应程序为: 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min,重复 45 次。以不含基因组 DNA 的反应为负对照。

1.4 电泳分析

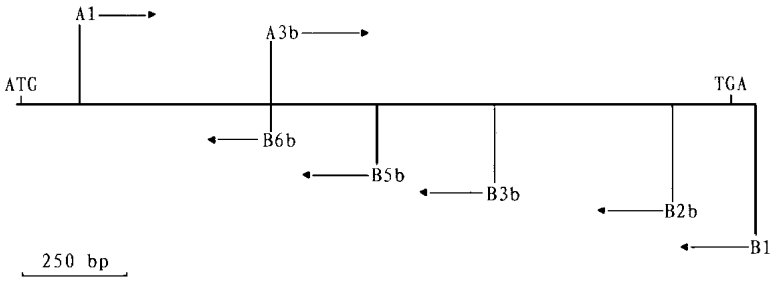

图 1　引物在 ALS 1 基因上的相对位置
Fig. 1　Relative position of primers in ALS gene 1

表 2　实验中使用的引物序列
Table 2　Primer sequence used in the experiment

名称 Name	序列(5′～3′) Sequence (5′～3′)	名称 Name	序列(5′～3′) Sequence (5′～3′)
A 1	CCATCTCCGCCGTTCTCAAC	B 2b	AACCGATCTTCCCATTGCAT
A 3b	GCTTTCTTTCTAGCTACTTC	B 3b	AACTGCGCCGCCCACATCTG
A 8	CCGATACATCAAATTCCGCG	B 5b	AACTCATCGTTACAAGGATA
B 1	ATCACCAGCATCATCTCTCA	B 6b	GAAGTAGCTAGAAAGAAAGC

DNA 扩增产物在 1 ×TBE 缓冲条件下,用 1.5 %琼脂糖胶分离,溴化乙锭染色,标准分子量为 1 kb 差别的 DNA 片段(BRL, Bethesda, MD, USA)。用 667 号黑白底片照相(美国 Polaroid)。

1.5　数据分析

采集重复出现的 DNA 扩增带,根据 Nei 和 Li 的相似性计算公式计算任何两个样品之间的相似性[22]:

$$\text{相似性指数 } (I) = (2^{*} N_{ab}) / (N_a + N_b)$$

其中, N_{ab} = 样品"a"和"b"共有的 DNA 带; N_a = 样品"a"的 DNA 带; N_b = 样品"b"的 DNA 带。遗传距离 (D) 依 $D = -\ln I$ 式计算。根据计算得到的遗传距离按 UPGMA 方法[23]对数据进行聚类分析。

2　结果与分析

2.1　ALS 基因在种间的变异

从 *B. oleracea* 种内选 3 个品种,从 *B. rapa* 和 *B. napus* 种内各选 2 个品种,每个品种来自不同的亚种。本实验对 7 个品种的 ALS 基因成功地进行了扩增,每一对引物重复扩增 2～3 次,9 对引物从 *B. oleracea*、*B. napus* 和 *B. rapa* 种内分别扩增出了 73、62 和 43 条 DNA 带,其中分别有 43、24 和 8 条带在各自的种内呈多态性。根据扩增出的 DNA 带数计算出 Nei-Li 相似系数,用 UPGMA 方法确定种及亚种间的相互关系。种内相似系数明显高于种间相似系数(表 3),每个种的亚种聚于一簇(图 2)。从聚类分析表明:1) *B. oleracea* 和 *B. rapa* 之间的关系较远,但彼此都与 *B. napus* 关系较近,这与 *B. napus* 的起源是一致的,因为 *B. napus* 是一双二倍体,被认为是 *B. oleracea* 和 *B. rapa* 相结合的结果[24];2) *B. rapa* 和 *B. napus* 之间的关系比 *B. oleracea* 和 *B. napus* 之间的关系近。有些扩增带尚能反映出 *B. napus* 的起源,例如引物 *A* 1 ×*B* 3*b* 在 *B. oleracea* 种

表3 用 ALS 基因引物对 (A 1 ×B 1, A 1 ×B 2b, A 1 ×B 3b, A 1 ×B 5b, A 1 ×B 6b, A3 b ×B 1, A 3b ×B 2b, A 8 ×B 6b)扩增产生的芸苔属亚种间的 Nei-Li 相似系数*

Table 3 Index of Nei-Li similarity among selected *Brassica* subspecies generated with ALS gene primer pairs (A 1 ×B 1, A 1 ×B 2b, A 1 ×B 3b, A 1 ×B 5b, A 1 ×B 6b, A 3b ×B 1, A 3b ×B 2b, A 8 ×B 6b)

	a	b	c	d	e	f	g
a	—						
b	0.7021	—					
c	0.6600	0.5854	—				
d	0.3409	0.4286	0.2895	—			
e	0.3409	0.3714	0.3421	0.9062	—		
f	0.4583	0.3077	0.3571	0.5000	0.4722	—	
g	0.3261	0.3514	0.2500	0.5000	0.5000	0.7632	—

* a. *B. oleracea* var. *capitata* 'Golden Acre';b. *B. oleracea* var. *ramosa* 'New Zealand Thousand Head';c. *B. oleracea* var. *costata* 'Couve Nabica';d. *B. rapa* var. *rapifera* 'Huang Man Jing';e. *B. rapa* var. *chinensis* 'Si Yue Man';f. *B. napus* var. *oleifera* 'Tanderm';g. *B. napus* var. *rapifera* 'Laurentian'

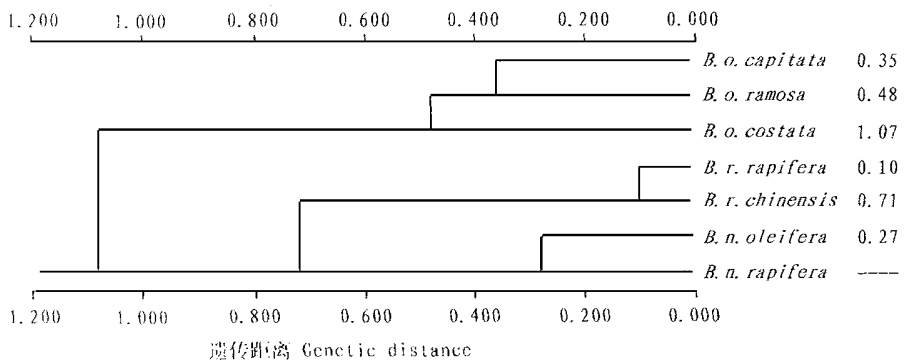

图2 根据 ALS 基因扩增数据计算 Nei-Li 相似系数,用 UPGMA 分析得到的芸苔属亚种间的相互关系

Fig. 2 Relationships between *Brassica* subspecies as determined by UPGMA analysis using Nei-Li similarities computed from PCR amplification data of ALS gene

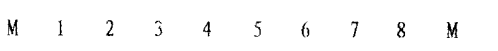

图3 引物对 A 1 ×B 3b 扩增 B. napus 品种基因组 DNA 的图谱

Fig. 3 Genomic DNA PCR patterns of *B. napus* accessions generated by primer pair A 1 ×B 3b

注: 1 Cascade; 2 Westar; 3 Tobin; 4 Span; 5 Per; 6 Bronowski; 7 Glacier; 8 Laurentian; M DNA Marker

间产生了多态性的 DNA 扩增片段(图 3)。

内扩增出 210 bp 的 DNA 带,在 *B. rapa* 种内扩增出 655 bp 的 DNA 带,这两条 DNA 带在 *B. napus* 品种间呈多态性分布(图 3)。在 3 个品种间也观察到了一些共有的 DNA 扩增片段,例如,引物 A 3b ×B 3b 在所调查的品种内均扩增出长度分别为 717 bp 和 767 bp 的 DNA 片段。

2.2 ALS 基因在亚种间的变异

用来自 ALS 基因的引物对 *B. oleracea*、*B. rapa* 和 *B. napus* 的 21 个亚种的基因组 DNA 进行了扩增。ALS 基因在亚种间的变异水平随物种而异。在 *B. rapa* 种内,大多数引物对产生一致的 DNA 片段谱带。在 *B. oleracea* 种内,除引物对 A 1 ×B 5b 外,其他引物对也产生一致的 DNA 片段谱带。有趣的是在 *B. napus* 种内,大多数引物对在调查的 8 个品种

2.3　ALS 基因在品种间的变异

从 *B. napus* var. *oleifera* 亚种内选 7 个品种,从 *B. napus* var. *rapifera* 亚种内选 1 个品种,来调查 ALS 基因在 *B. napus* 品种间的遗传变异。7 个引物对产生了 50 条 DNA 片段,其中 28 条 DNA 片段呈多态性。根据扩增出的 DNA 带数计算出 Nei-Li 相似系数(表 4),用 UPGMA 方法确定 *B. napus* 品种间的相互关系。聚类表明将 *B. napus* var. *oleifera* 的 7 个品种聚为一簇,通过品种'Span'与亚种 *B. rapifera* 的品种'Laurentian'相连(图 4)。这一结果表明,ALS 基因家族可用于区分 *B. napus* 的品种。

表 4　用 ALS 基因引物对(A1×B1,A1×B2b,A1×B3b,A1×B5b,A1×B6b,A3b×B1,A3b×B3b)扩增产生的 B. napus 品种间的 Nei-Li 相似系数

Table 4　Index of Nei-Li similarity of among accessions of *B. napus* generated with ALS gene primer pairs (A1×B1,A1×B2b,A1×B3b,A1×B5b,A1×B6b,A3b×B1,A3b×B3b)

	Cascade	Westar	Tobin	Span	Per	Bronowski	Glacier	Laurentian
Cascade	—							
Westar	0.8889	—						
Tobin	0.8732	0.8169	—					
Span	0.8333	0.8333	0.8732	—				
Per	0.8571	0.8286	0.8696	0.8286	—			
Bronowski	0.9091	0.8571	0.8158	0.8312	0.8533	—		
Glacier	0.8800	0.8800	0.8108	0.8533	0.8767	0.9250	—	
Laurentian	0.8205	0.8462	0.8052	0.8205	0.7895	0.8193	0.8889	—

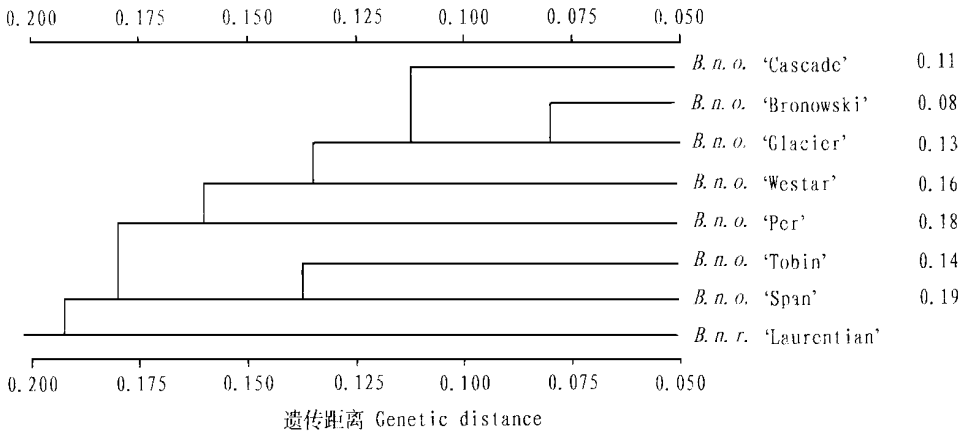

图 4　根据 ALS 基因扩增带数计算出的 Nei-Li 相似系数,用 UPGMA 聚类得到的 B. napus 品种间的相互关系

Fig. 4　Relationships between *B. napus* accessions as determined by UPGMA analysis using Nei-Li similarities computed from PCR amplification data of ALS gene

3　结论

本研究表明:1) ALS 基因在芸苔属亚种和品种间存在广泛的遗传变异;2) ALS 基因在不同的种内,变异程度不同;3) 在亚种水平上,ALS 基因在 *B. oleracea* 种内的遗传变异比在 *B. napus* 种内的遗传变异低,但比在 *B. rapa* 种内的遗传变异高;4) 在 *B. napus* 品种间发现了相当大的遗传变异,表明 ALS 基因可用来作为遗传标记区分 *B. napus* 的品种。

参 考 文 献

1 Lawther R P, Nichols B, Zurawski G et al. The nucleotide sequence preceding and including of the *ilv* E gene of the *ilv* GEDA operon of *Eschierichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, 1979, **7**: 2289～2301

2 Lawther R P, Calhoun D H, Adams C W et al. Molecular basis of valine resistance in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1981, **78**: 922～925

3 Newman T, Friden P, Sutton A et al. Cloning and expressing of the *ilv* B gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.*, 1982, **186**: 378～384

4 Squires C H, DeFelice M, Wessler S R et al. Physical characterization of the *ilv* HI operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1981, **147**: 797～804

5 Squires C H, DeFelice M, Devereux J et al. Molecular structure of *ilv* H and its evolutionary relationship to *ilv* G in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic. Acids. Res.*, 1983, **11**: 5299～5313

6 Wek R C, Hauser C A, Hatfield G W. The nucleotide sequence of the *ilv* BN operon of *Escherichia coli*: sequence homologies of the acetohydroxyacid synthase isozymes. *Nucleic. Acids. Res.*, 1985, **13**: 3995～4010

7 Eoyang L, Silverman P M. Purification and subunit composition of acetohydroxyacid synthase I from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1984, **157**: 184～189

8 Grimminger H, Umbarger H E. Acetohydroxyacid synthase I of *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.*, 1979, **137**: 846～853

9 Schloss J V, van Dyk J V, Vasta J F et al. Purification and properties of *Salmonella typhimurium* acetolactate synthase isozyme II from *Escherichia coli* HB101/pDU9. *Biochemistry*, 1985, **24**: 4952～4959

10 Falco S C, Dumas K D. Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulometuron methyl. *Genetics*, 1985, **109**: 21～35

11 Bedbrook J R, Chaleff R S, Falco S C et al. Nucleic acid fragment herbicide resistant plant acetolactate synthase. *European Patent application* 0257993, 1987

12 Singh B K, Newhouse K E, Stidham M A et al. Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from plants. In: Barak Z, Chipman D M, Schloss J V (eds.), *Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids*, Weinheim, FRG: VCH Publishers, 1990, 357～372

13 Haughn G, Somerville C. Sulfonylurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 1986, **204**: 430～434

14 Lee K Y, Townsend J, Tepperman J et al. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.*, 1988, **7**: 1241～1248

15 Mazur B J, Chui C F, Smith J K. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiol.*, 1987, **85**: 1110～1117

16 Rutledge R G, Miki B L. Characterization of the acetolactate synthase genes from *Brassica*. *Genome*, 1988, **30** (Suppl. 1): 454

17 Wiersma P A, Schiemann M G, Condie J A et al. Isolation, expression and phylogenetic inheritance of an acetolactate synthase gene from *Brassica napus*. *Mol. Gen. Genet.*, 1989, **219**: 413～420

18 Rutledge R G, Quellet T, Hattori J et al. Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, **229**: 31～40

19 Colosi J C, Schaal B A. Tissue grinding with ball bearing and vortex mixer for DNA extraction. *Nucleic Acids Res.*, 1993, **21**: 1051～1052

20 Hillis D M, Larson A, Davis S K et al. Nucleic Acids III. Sequencing. In: Hillis D M, Mortiz C (eds.), *Molecular Systematics*, Sunderland: Sinauer, 1990, 318～370

21 Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, **239**: 487～491

22 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.*, 1979, **76**: 5269～5273

23 Sneath P H A, Sokal R R. Numerical taxonomy. San Francisco: Freeman, 1973

24 U N. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and pecular mode of fertilization. *Japan J. Bot*, 1935, **7**: 389～452