

研究报告

A Letter

甘蓝型油菜隐性核不育系及其 DH 系的纯度的 SSR 检测

林茂¹, 杨斌², 肖华贵², 饶勇², 李超^{2,3}

1. 贵州省农作物品质资源研究所, 贵阳, 550006

2. 贵州省油料研究所, 贵阳, 550006

3. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆, 400716

✉ 通讯作者: gzlichao@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第6篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0006

收稿日期: 2010年09月30日

接受日期: 2011年12月25日

发表日期: 2011年01月25日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

林茂等, 2011, 甘蓝型油菜隐性核不育系及其 DH 系的纯度的 SSR 检测, 分子植物育种 Vol.9 No.6 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0006)

摘要 为了鉴定隐性核不育系的纯度, 用 20 对 SSR 引物对 24 个甘蓝型隐性核不育两型系 NAB-2 及由它产生的 DH 系进行筛选, 结果有 18 对引物在两类材料之间具有多态性, 共 31 个多态性位点, 能将 DH 植株和姊妹交后代明显区分开来的引物有 6 对。在 DH 植株中检测到 18 个单株纯合性一致, 另外 6 个单株存在一定的多态性差异。研究认为, DH 植株更能反映出供体群体的遗传纯合状况, 为后续实验选择可靠的材料提供依据。

关键词 甘蓝型油菜(*Brassica napus*); SSR 分子标记; 隐性核不育; DH 系; 纯度鉴定

Purity Study on Recessive Genic Male Sterile Line and DH-line in *Brassica napus* by SSR Molecular Markers

Lin Mao¹, Yang Bin², Xiao Hua-gui², Rao Yong², Li Chao^{2,3}

1. Guizhou Research Institute of Crops Germplasm Resources, Guiyang 550006, P.R. China

2. Institute of Oil Crops, Guizhou, Guiyang, 550006, P.R. China

3. Chongqing Engineering Research Center for Rapeseed, Chongqing 400716, P.R. China

✉ Corresponding author, gzlichao@126.com; ✉ Authors

Abstract In order to identify the purity of recessive GMS line, twenty pairs of SSR primers were used to select twenty four recessive GMS two-types line NAB-2 and their DH lines in *brassica napus* L. Eighteen pairs of primers had polymorphism between NAB-2 and DH lines, totally thirty polymorphic loci, six pairs of primers can distinguish them obviously. In the DH lines, eighteen lines are homozygous, the other six plants are some differences with them in polymorphism. The result shows that DH line could better reflect the genetic homozygous status of donor parents and provide basis for selection of reliable materials in follow-up experiment.

Keywords *Brassica napus* L.; SSR Molecular markers; Recessive genic Male sterile; DH-line, Purity test

研究背景

生物工程在油菜遗传改良中的应用加速了优质、高油、高产与抗性育种的结合, 尤其是小孢子培养技术在油菜育种材料创新上的广泛应用, 不断获得更多的优质种质资源, 促成优质高产杂交油菜新品种(组合)的选育, 也为油菜分子标记辅助育种及遗传工程深入研究提供了良好的供试材料。

分子标记辅助选择在油菜遗传育种研究中已进行广泛应用, 俎峰等(2010年)利用分子标记研究油菜隐性核不育7-7365AB的遗传模式, 认为*BnMs4*和*BnRf*很可能属于复等位基因; 陈凤祥等(1993,

1998年)通过经典遗传研究, 孙超才等(2002年)通过测交试验分析, 分别证实油菜隐性核不育材料9012A和20118A的育性都由2对隐性重叠基因和1对隐性上位抑制基因互作控制; 王军等(2004年)通过测交、自交以及与117AB、S45AB等位性分析, 认为甘蓝型油菜核不育系ZWA为隐性上位互作核不育类型; Xiao等(2008年)通过7-7365AB与9012AB之间的等位性试验, 认为控制7-7365A与9012A不育的基因是等位的。

用隐性细胞核雄性不育系作为亲本之一, 亲本的纯度直接影响到组配的杂交种的纯度及后代的

分离比例。如采用单倍体培养隐性细胞核雄性不育系中可育株构建的DH系作为组配杂交种的亲本之一, 杂交种的后代分离比例基本都会符合孟德尔遗传规律及数量性状分离情况。然而, 隐性细胞核雄性不育系连续进行5代姊妹交后是否达到完全纯合? 与通过小孢子培养隐性细胞核雄性不育系中雄性可育株产生的DH系相比较, 两者的纯度差异有多大? 本文利用分子标记对隐性核不育系经过6代姊妹交形成的株系与其姊妹交组合构建的DH系进行纯度比较, 检测多世代姊妹交株系作为QTL作图群体亲本之一的纯度情况, 为进一步阐明DH系作为供体亲本构建QTL作图群体的可靠性提供理论依据。

1 结果与分析

1.1 甘蓝型油菜隐性核不育系可育株的游离小孢子培养

初花期取NAB-2可育株花蕾通过花粉游离小孢子培养、胚状体诱导, 每个姊妹交组合培育出3-6株, 共培育出100余株不同胚状体的DH植株(图1), 经过室内炼苗培养, 最后移栽到大田只有90棵DH植株存活, 平均每个姊妹交组合培育出3.75株。

1.2 DH植株的田间性状调查

调查了田间24个DH植株的育性, 结果有23株表现为雄性不育, 有1株为雄性完全可育, 这在随机挑选的24个DH植株中, 不育株率占95.8%, 可育



图1 NAB-2通过小孢子培养诱导的部分DH植株
Figure 1 Microspore culture plants of NAB-2 *Brassica napus* L.

株仅占4.2%, 并且可育株的雄性完成正常可育, 同时不育株的雄蕊完全退化, 这是由于实验过程中染色体没有成功加倍还是携带不育基因的材料更有利于小孢子培养, 还需要进一步研究。在调查的24个DH植株中, 茎粗、一次有效分枝数、叶片等都比相应的姊妹交后代长势强。

1.3 SSR分子标记鉴定隐性核不育系及DH系的纯度

用20对SSR引物对24个NAB-2姊妹交组合后代及其构建的24个DH植株进行纯度比较鉴定, 在两类材料之间有18对引物产生多态性(表1), 扩增出31个多态性位点, 平均每对引物有1.72个。在18对引物中有6对引物(325, 599, 624, 650, 652和821)能明显区分DH植株和姊妹交后代(图2), 其它12对引物在姊妹交后代和相应的DH植株间没有差异, 但在DH植株内有几个单株表现出显著差异(图3), 它们是DZ20、DZ21、DZ22、DZ23、DZ24。在18对引物中有11对都检测出DH植株中的一株可育株, 即DZ17, 它来源于DZ41姊妹交后代, 该植株表现为雄性完全可育。

观察24个DH植株和24个姊妹交后代株系间的纯度, 分子标记结果显示24个DH植株中有6株与其他DH植株存在多态性, 24个姊妹交后代纯合性一致, 没有多态性差异。研究表明, 利用SSR检测隐性核不育系姊妹交后代的纯度, 难以确定株系间的纯度, 但通过检测相应DH植株来推断姊妹交后代的纯度, 结果更加可靠。

1.4 隐性核不育系及其胚状体苗的聚类分析

利用SSR分子标记数据计算NAB-2胚状体苗与NAB-2姊妹交后代的遗传相似性系数, 采用DPS软件最短距离法构建了遗传关系聚类图(图4), 从树状聚类图上可以看出, 在相似性系数1.00时, 48个材料划分为DH植株和姊妹交后代两大类群, 每个类群都由24个单株构成, 其中不育系的姊妹交后代个体之间没有差异。当相似系数为0.66时, 24个DH植株又分成了两个亚类群, 其中一个亚类群由5个单株构成, 另一亚类群由19个单株构成, 并且DZ17与其他的DH植株单独分为一类, 表明在相似越小时, 材料之间的差异逐渐体现出来。在相似系数为0.41时, 完全可以将DH植株中与其他差异较大的6个单株鉴定出来。此外, 从聚类结果显示DH植株

之间的遗传距离小于姊妹交后代之后的遗传距离。

(GMS)是甘蓝型油菜杂种优势利用的两条主要途径。在细胞质雄性不育中, 波里马细胞质雄性不育(pol CMS))是目前国内外最有实用价值的细胞质雄性不

2讨论

细胞质雄性不育(CMS)和细胞核雄性不育

表1 SSR分析所用引物序列及扩增结果

Table 1 The primer alignment and amplified results of SSR analysis

编号 Number	名称 Name	正向引物 Forward primer	反向引物 reverse primer	多态性带 polymorphism
325	CB10022	5'-AACAAACCAACATAGTCCC-3'	5'-GTTGACTTTGACCTTGACTT-3'	2
390	CB10364	5'-GAGACGATGCAAAGATCG-3'	5'-TGCAGACACATTCGAACA-3'	2
391	CB10369	5'-CATTACAGGACCAGAGC-3'	5'-CAAAGCCAAGACAACCAT-3'	1
599	sS2331B	5'-TGTCCTGTTTTCTGTGCTGG-3'	5'-GCCAACGCTAGTTTTGCTTC-3'	3
621	sN11516	5'-GCGATCTCCTCAGGCATAGT-3'	5'-CCACGCAAGCTGAAACATAA-3'	2
624	sNRD03	5'-GAAGATTCGAGCTCTTTCGG-3'	5'-CGTTTCAGAATCATATTGTATTTGCT-3'	2
625	sORF73	5'-CGTGGGCCAAGCTTAGATTA-3'	5'-CGTTCAGAAGACACAGATCAAA-3'	2
626	sN12353	5'-CCGGCTTGGTTCGATACTTA-3'	5'-TTGCGAATCTTTAAGGGACG-3'	2
627	sR9222	5'-CACCGAACAAAACACTGAGGGT-3'	5'-CGTTTCACTGCGTTCTACCA-3'	2
639	sR7223	5'-AGGACCCGACTTTCCTTGTT-3'	5'-ACCAAACCTCGGCGTACAAAT-3'	1
650	sR9447	5'-AAATTCGAAAATGCAAACGG-3'	5'-CCAATCTTGAACAATAGAAGATG-3'	2
652	sR9251J	5'-TCTCCAGTACGGGGAAGAGA-3'	5'-CAAAGAAGCCATGTGTGGAA-3'	2
653	sR12777	5'-CAAGCAGTTTAAGGAACCGC-3'	5'-ATAATTGCATTTTGCTCCGC-3'	2
697	BRMS071	5'-CAAAGCGAGAAAGTGCAGTTGAGAG-3'	5'-TCCACGAAACTACTGCAGATTGAAA-3'	2
788	cnu_ssr050	5'-AGCCCAAGCTCGTATTCCTT-3'	5'-AAAATCGGGACAACCACCTA-3'	0
792	cnu_ssr090	5'-GCAAAGATCGGCGAAGAAGA-3'	5'-TGCAGACACATTCGAACAAACA-3'	0
799	KBRH139B23	5'-ATCTCATGGTTGGTTCACCG-3'	5'-ATTTCCAAAACACACACGCA-3'	1
810	EJU4	5'-CACCTTATCATCTCTATCCC-3'	5'-CCTCTGTTTCTCTCTTGTG-3'	1
811	EJU5	5'-GGCACGTACATGGAGGATTC-3'	5'-TGTTGGTCGAGCTGTTTCAG-3'	1
821	ENA19	5'-AAGTTACCAAGGAGAGGACAG-3'	5'-AAAGGGACGCTACAAGTCA-3'	1

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

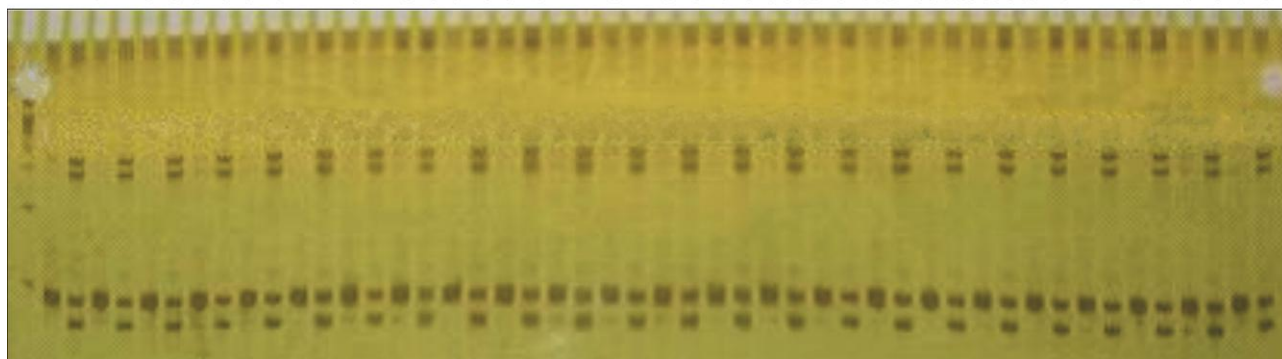


图2 引物821在DH植株和姊妹交后代的指纹图谱

注: 泳道1,3,5,...45,47是胚状体苗; 2,4,6,...46,48是姊妹交后代

Figure 2 Amplified profile by SSR primer (821) between the DH plants and first-cousin cross offspring

Note: The offspring increased in odd path of electrophoresis from DH plants and in even path of electrophoresis from first-cousin cross offspring

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

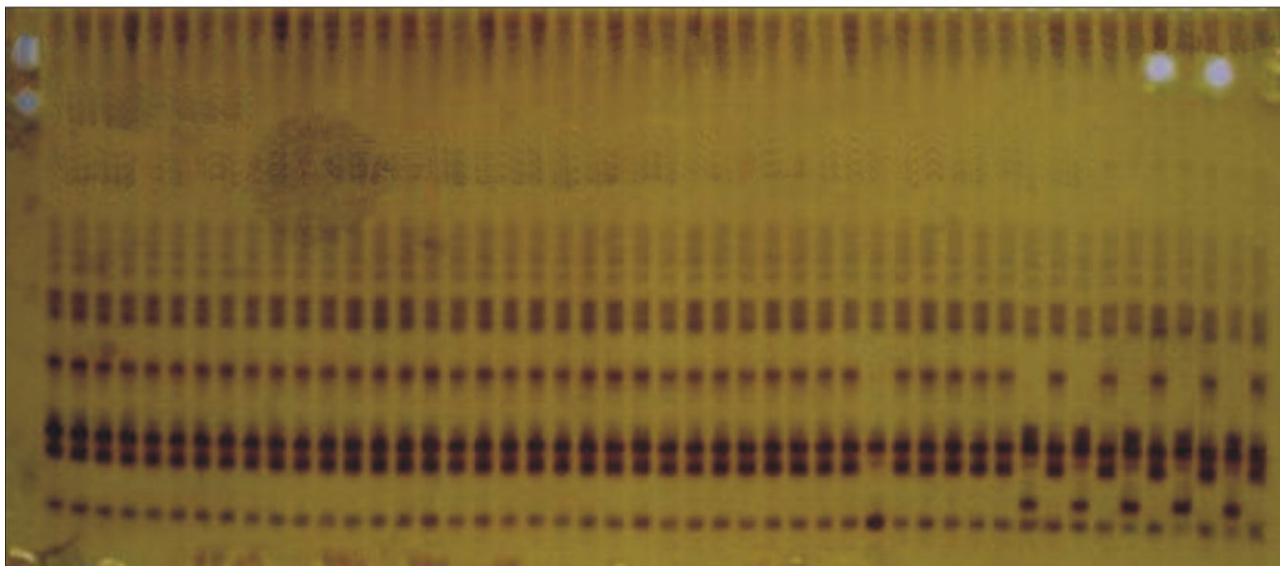


图3 引物625对DH植株和姊妹交株系的扩增结果

注: 泳道1,3,5,...45,47是胚状体苗; 2,4,6,...46,48是姊妹交后代

Figure 3 DNA mapping by SSR 625 primer between the DH plants and first-cousin cross offspring

Note: The offspring increased in odd path of electrophoresis from DH plants and in even path of electrophoresis from first-cousin cross offspring

育系统。在细胞核雄性不育中,存在着两类不育系统,一类是显性细胞核雄性不育(DGMS),另一类是隐性细胞核雄性不育(RGMS)。

通过20对SSR引物对24个甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育系NAB-2姊妹交F₁代及其产生的DH株系进行纯度比较,有18对引物扩增出31个多态性位点,平均每对引物扩增出1.72个多态性位点。在18对引物中有17对引物在DH植株之间产生了多态性,11对引物检测出24个DH植株中唯一株可育株,6对引物能将姊妹交后代和相应的DH植株明显区分开,但没有一个引物在姊妹交后代中扩增出多态性,似乎说明了姊妹交后代的株系之间纯合性高,遗传差异很小。然而,将这24个姊妹交后代通过小孢子离体培养,所诱导出的DH植株再进行SSR标记鉴定,却显示出单株之间存在遗传多样性,由此可见,对于甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育系的纯度鉴定,通过小孢子培养后进行SSR检测DH植株,更能显示出不育系株系间的纯度。该研究结果从NAB-2的选育过程得以验证,该隐性核不育系是通过了七代姊妹交选育的,单株之间遗传差异还存在。

理论上讲,在甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育

系中,可育植株的小孢子具有不育和可育两种基因型,通过游离小孢子离体培养后的DH植株中,可育株和不育株应各占50%,但是本研究结果显示,在田间观察24株DH植株中,有23株表现雄性完全不育,1株表现雄性可育。出现1株可育株是携带不育基因的小孢子更易诱导成苗和加倍还是抽样所带来的误差所致?或者是因为在小孢子游离培养时染色体没能加倍?这还需要进一步研究。在24个DH植株内通过SSR标记显示有6株在DNA水平上存在差异,18对多态性引物中11对引物都检测出了DH植株中的1株雄性可育株,能否在11对引物中筛选出与不育基因紧密连锁的标记值得深入研究。此外,本研究认为,对于甘蓝型油菜隐性细胞核雄性不育系,检测姊妹交后代的纯度不如检测其通过游离小孢子培养后的DH植株结果可靠。当隐性细胞核雄性不育系作为构建QTL作图群体亲本选择时,应充分考虑亲本的纯度。

利用SSR标记的检测油菜品系纯度,优点很多:对基因组DNA质量要求低、DNA用量少、扩增产物稳定、标记图谱信赖度高、共显性标记、带型简单,适于大规模快速分析,广泛应用于遗传多样性分析、

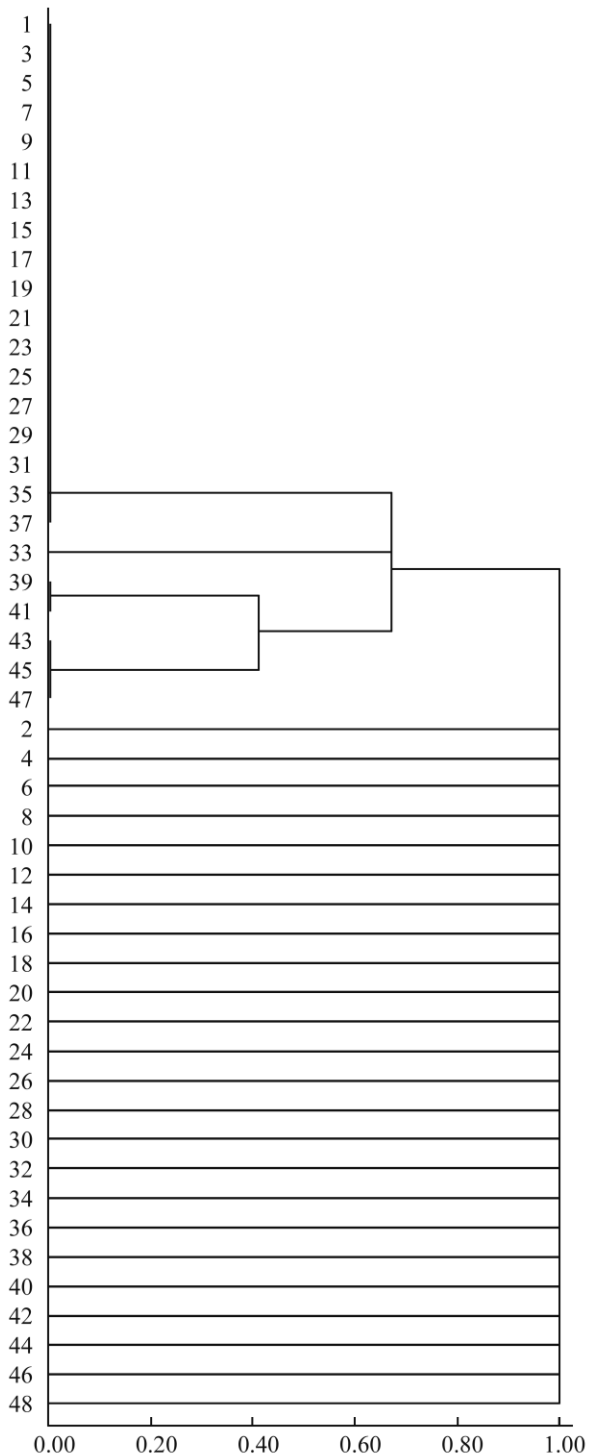


图4 隐性核不育系NAB-2姊妹交后代与胚状体苗的SSR分子聚类分析

Figure 4 Dendrogram for the plants of embryoid and the first-cousin cross offspring based on SSR Markers

图谱构建及种质资源评估方面。

3材料与方法

3.1材料及群体构建

贵州省油料研究所(前身为贵州省农业科学院油料研究所)2001年春发现在引进的杂交油菜组合杂901 F₂中, 分离出不育株系和可育株, 选择不育株与自育双低品系R-9杂交, 次年开始从杂交后代中分离出的不育株与可育株进行连续多年多代姊妹交, 通过5代姊妹交获得稳定双低隐性细胞核不育系NAB-2。2007年用NAB-2中24个不育株与24个可育株作成对姊妹交, 获得24个姊妹交组合(编号为DZ25~Z48, 表2), 同年秋天种植在贵州省农业科学院内试验地, 冬季提取各组合DNA, 包括12个不育株(DZ25, DZ27~30, DZ34~35, DZ38~39, DZ41~42和DZ44)和12个可育株。2008年春取姊妹交后代可育株花粉进行游离小孢子培养, 培养的DH植株移栽到贵州省农业科学院内试验地。

3.2小孢子培养

小孢子培养参考李超(2008)的方法。培养的DH植株按一个组合后代选择一个胚, 一个胚诱导出来的植株列为一个DH单株, 编号见表2, 由24个不同DH植株构成DH系群体。

3.3分子标记

2008年冬季采用天根快速植物DNA试剂盒提取基因组DNA, SSR引物由重庆市油菜工程技术研究中心提供(表1), 分子标记参考付福友(2007年)的方法。反应体系21 μL: 包括ddH₂O 7.5 μL, 10×Taq Buffer (含Mg²⁺) 1.2 μL, dNTPs (10 Mm) 0.2 μL, F-Primer (50 ng/μL) 0.5 μL, P-Primer (50 ng/μL) 0.5 μL, Taqase (5 U/μL) 0.10 μL, DNA templete (50-100 ng/μL) 1.0 μL, Mineral oil 10.0 μL。扩增程序: 94℃ 5 min, (94℃ 45s, 55℃ 45s, 72℃ 1 min)×35cycles, 72℃ 10 min。电泳及银染试剂: 封胶琼脂1.5%: 琼脂1.5 g, 加水100 mL; 固定液1 000 mL: 无水乙醇100 mL, 冰醋酸5 mL, 水895 mL; 显色液500 mL: NaOH 7.5 g, 甲醛5.5 mL, 加水定容500 mL; 0.2%染色液AgNO₃ 1 000 mL: AgNO₃ 2.0 g, 水1 000 mL; 30%丙烯酰胺 500 mL: 丙烯酰胺145 g: N-N-二甲基双丙烯酰胺5 g, 加水定容至500 mL; 5×TBE Buffer 1 000 mL: Tris碱 54.0 g, 硼酸27.5 g, 0.5 mol/L pH8.0的EDTA 20 mL,

表2 材料编号

Table 2 Serial number of the materials

DH 植株 DH plant	电泳所在泳道 Serial number of electrophor- esis	DH 植株来源的 姊妹交组合 DH plant from whose first-cousin cross offspring	电泳所在泳道 Serial number of electrophor- esis
DZ01	1	DZ25	2
DZ02	3	DZ26	4
DZ03	5	DZ27	6
DZ04	7	DZ28	8
DZ05	9	DZ29	10
DZ06	11	DZ30	12
DZ07	13	DZ31	14
DZ08	15	DZ32	16
DZ09	17	DZ33	18
DZ10	19	DZ34	20
DZ11	21	DZ35	22
DZ12	23	DZ36	24
DZ13	25	DZ37	26
DZ14	27	DZ38	28
DZ15	29	DZ39	30
DZ16	31	DZ40	32
DZ17	33	DZ41	34
DZ18	35	DZ42	36
DZ19	37	DZ43	38
DZ20	39	DZ44	40
DZ21	41	DZ45	42
DZ22	43	DZ46	44
DZ23	45	DZ47	46
DZ24	47	DZ48	48

加水定容1 000 mL; 50×TAE buffer 1 000 mL: 冰醋酸57.1 mL, Tris碱242.0 g, 0.5 M pH8.0的EDTA 200 mL, 加水定容1 000 mL; 6×电泳上样buffer 100 mL: 溴酚蓝0.25 g, 二甲苯氰0.25 g, 蔗糖40.0 g, 加水定容100 mL。电泳及银染方法: 电泳用10%的聚丙烯酰胺凝胶, 缓冲液为0.5×TBE, 加上样buffer 1.5 μL, 上样量1.2 μL, 电流350A, 电压350 V电泳35 min; 银染时在固定液中固定12 min, 然后染色12 min, 用双蒸水漂洗30s, 最后显色, 直至谱带清晰。

作者贡献

林茂、杨斌、肖华贵是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 林茂完成数据分析, 论文初稿的写作; 杨斌和肖

华贵参与实验设计, 田间实验工作及试验结果分析; 饶勇是项目的指导和管理负责人; 李超是项目的构思者及实验设计负责人, 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863计划(2009AA101105)、贵州省科学技术基金项目: 黔科合J字[2007]2081号、贵州省农业科学院人才项目: 黔农科合(人才) 08004号资助。感谢贵州省油料研究所和西南大学农学与生物科技学院为本实验提供了便利的实验设备和场所、感谢重庆市油菜工程技术研究中心提供SSR引物, 同时, 感谢李加纳教授在本实验过程中提供的技术支持和有益的建议, 为实验的顺利完成给予了极大的帮助。

参考文献

- Chen F.X., Hu B.C., Li Q.S., and Zhang M.L., 1993, Discovery and study of genic male sterility (GMS) material 9012A in *Brassica napus* L., *Acta (Agriculae Universitatis Pekinensis)*, 19: 57-61 (陈凤祥, 胡宝成, 李强生, 张曼琳, 1993, 甘蓝型油菜细胞核雄性不育材料9012A的发现与初步研究, 北京农业大学学报, 19: 57-61)
- Chen F.X., Hu B.C., Li C., Li Q.S., Chen W.S., and Zhang M.L., 1998, Genetic studies on GMS in *Brassica napus* L.: I. Inheritance of recessive GMS line 9012A, *Acta (Agronomica Sinica)*, 24(4): 431-438 (陈凤祥, 胡宝成, 李成, 李强生, 陈维生, 张曼琳. 1998, 甘蓝型油菜细胞核雄性不育性的遗传研究: I. 隐性核不育系9012A的遗传. 作物学报, 24(4): 431-438)
- Fu F.Y., Chai Y.R., Liu L.Z., Chen L., Yang T., Jin M.Y., Ma A.F., Yan X.Y., Zhang Z.S., and Li J.N., 2007, Localization of QTLs for seed color using recombinant inbred lines of *Brassica napus* in different environments. *Genome*, 50(9):840-54
- Li C., Lin M., Xiao H.G., Yang B., Rao Y., and Li J.N. 2008, Improvement of culture techniques in DH-line of *Brassica napus* L. (*Journal of Anhui agriculture science*), 36(32): 13972-13974, 14059 (李超, 林茂, 肖华贵, 杨斌, 饶勇, 2008, 甘蓝型油菜DH系培养技术优化, 安徽农业科学, 36(32): 13972-13974, 14059)
- Sun C.C., Zhao H., Wang W.R., Li Y.L., Qian X.F., and Fang G.H., 2002, Inheritance and utilization of recessive genic male sterile line 20118A in *Brassica napus* L. (*Chinese Journal of Oil Crop Sciences*), 24(4): 1-4 (孙超才, 赵华, 王伟荣, 李延莉, 钱小芳, 方光华, 2002, 甘蓝型油菜隐性核不育系20118A的遗传与利用探讨, 中国油料作物学报, 24(4): 1-4)

- Wang J., Zhang T.P., Wei Z.F., and Li D.W., 2004, Inheritance and utilization of recessive genic male sterile line ZWA in *Brassica napus* L., (*Seed*), 23(5): 8-11 (王军, 张太平, 魏忠芬, 李德文, 2004, 甘蓝型油菜隐性核不育材料ZWA的遗传利用研究, 种子, 23(5): 8-11)
- Xiao L., Yi B., Chen Y.F., Huang Z., Chen W., Ma C.Z., Tu J.X., and Fu T.D., 2008, Molecular markers linked to *Bn*; *rf*: A recessive epistatic inhibitor gene of recessive genic male sterility in *Brassica napus* L. *Euphytica*, 164: 377-384
- Zu F., Xia S.Q., Dun X.L., Zhou Z.F., Zeng F.Q., Yi B., Wen J., Ma C.Z., Shen J.X., Tu J.X., and Fu T.D., 2010, Analysis of Genetic Model for a Recessive Genic Male Sterile Line 7-7365AB in *Brassica napus* L., Based on Molecular Markers (*Scientia Agricultura Sinica*), 43(15): 3067-3075 (俎峰, 夏胜前, 顿小玲, 周正富, 曾芳琴, 易斌, 文静, 马朝芝, 沈金雄, 涂金星, 傅廷栋, 2010, 基于分子标记的油菜隐性核不育7-7365AB遗传模式探究, 中国农业科学, 43(15): 3067-3075)

 **5thPublisher**是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>