

网络出版时间:2014-06-21 18:03

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.031

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.031.html>

甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 4 个恢复系 分子标记的初步研究

张 搏,董军刚,胡永敏,葛 娟,董振生

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**对甘蓝型油菜 Ogu CMS 恢复基因(*Rfo*)设计的特异分子标记进行检测,为选育有别于国外的同类恢复材料提供依据。**【方法】**以甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 的保持系及其恢复系 1601、SR36、SR58、1628 为材料,选取 1 个基于 Ogu CMS 恢复基因设计的特异分子标记和 5 个与恢复基因连锁的萝卜标记,对甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 的 4 个恢复系进行恢复基因 *Rfo* 分子标记检测,并与国外同类恢复系 RRH1、R113、R2000 的检测结果进行初步比较。**【结果】**甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 的 4 个恢复系 1601、SR36、SR58、1628 均存在 Ogu CMS 恢复基因。与 *Rfo* 连锁的萝卜基因区段的分子标记检测比较表明,恢复系 1601、1628 连锁的萝卜片段长度短于国外同类恢复系 R113;恢复系 SR36、SR58 与 RRH1 连锁的萝卜片段长度相近,但是 SR58 却缺少 1601、1628、SR36 共有的 1 个标记 SG34。**【结论】**甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 的恢复系 1601、SR58、1628 可能是有别于国外同类恢复系 RRH1、R113、R2000 的萝卜质恢复材料。

【关键词】 甘蓝型油菜;Ogu CMS 恢复系;萝卜片段;分子标记

【中图分类号】 S330;S565.403.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)07-0029-05

Preliminary research on molecular markers of four Ogu CMS 1575A restorers in *Brassica napus*

ZHANG Bo,DONG Jun-gang,HU Yong-min,GE Juan,DONG Zhen-sheng

(College of Agronomy,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: **【Objective】** This study detected the specific markers designed for Ogu CMS restoring gene (*Rfo*) to provide a reference for breeding restorer materials different from similar foreign restorer materials. **【Method】** Taking the maintainers and the four restorer lines 1601,SR36,SR58,and 1628 of Ogu CMS 1575A in *Brassica napus* as materials,one specific molecular marker designed for Ogu CMS restoring gene (*Rfo*) and five radish molecular markers linked to *Rfo* were picked to detect the molecular markers of four Ogu CMS 1575A restorers and compare them with similar foreign restorers (RRH1,R113,and R2000). **【Result】** The four restorer materials 1601,SR36,SR58,and 1628 all contained Ogu CMS restorer gene. Comparing with the radish molecular markers linked to *Rfo*,the lengths of radish fragments in 1601 and 1628 were shorter than that of similar foreign restorer line R113. SR36 and SR58 had similar length of radish fragment to RRH1,but SR58 lacked marker SG34 that 1601,1628 and SR36 had. **【Conclusion】** 1601,SR58,and 1628 were different from similar foreign restorer lines RRH1,R113,and R2000.

Key words: *Brassica napus*; Ogu CMS restorer; radish-fragment; molecular markers

【收稿日期】 2013-05-20

【基金项目】 陕西省科技统筹创新工程计划项目“主要粮油作物新品种选育”(2011KTZB02-01-03)

【作者简介】 张 搏(1988—),男,辽宁铁岭人,在读硕士,主要从事作物杂种优势理论与应用研究。E-mail:farmer.888@163.com

【通信作者】 董振生(1957—),男,陕西永寿人,研究员,硕士生导师,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail:dzs05319@163.com

杂种优势是自然界普遍存在的一种生物现象,表现为两个亲本间杂交子代的某些性状优于双亲,因此在油菜育种工作中被广泛应用。在甘蓝型油菜杂种优势利用系统中,细胞质雄性不育系易于获得全不育群体,因此备受研究者青睐。目前已知的甘蓝型油菜细胞质雄性不育系有波里马细胞质不育系(pol CMS)、萝卜细胞质不育系(Ogu CMS)、陕 2A 细胞质不育系(Shan 2A CMS)、nap 细胞质不育系(nap CMS)。其中 pol CMS、Shan 2A CMS、nap CMS 均是温敏不育系,当环境温度变化到一定程度,这 3 种不育系均会恢复育性;而源于萝卜细胞质的 Ogu CMS 则具有不育彻底、易于保持的明显优势,是甘蓝型油菜中最为理想的杂种优势利用途径^[1-2]。

Ogu CMS 的恢复系筛选十分困难,直到 Bonnet(1977 年)与 Nieuwhof(1990 年)发现一些欧洲的萝卜品种中存在 Ogu CMS 的恢复基因(*Rfo*),并由 Desloire 等^[3]利用图位克隆方法将 Ogu CMS 的恢复基因 *Rfo* 定位在 1 个 15 kb 的 DNA 片段上,但至今在整个芸苔属作物中尚未找到 Ogu CMS 的恢复基因^[4-5]。

最初的恢复材料对 Ogu CMS 的育性只能起到部分恢复的作用,它是 Heyn^[6]通过有性杂交将萝卜(萝卜×甘蓝型油菜杂交的双二倍体)中的萝卜恢复基因导入到甘蓝型油菜获得的。之后 Pelletier 利用原生质体融合的方法,获得了甘蓝型油菜性状完全恢复株,但该恢复材料农艺性状差,不能直接用于商业生产,这主要是由于恢复基因紧密连锁着萝卜染色体片段与高硫苷基因^[7-9]。虽然后来 Delourme 育成了低硫苷恢复系,但其他与恢复基因连锁的萝卜基因仍明显影响恢复材料的性状^[10-13]。2005 年辛根塔(又称先正达)参与股份公司发现,Ogura 萝卜的核酸片段在育性基因座与芥子油基因座之间断裂并重新连接产生 BLR1 重组现象,并以 BLR-038 与雄性不育系杂交获得了具有优良农艺性状的低硫苷杂种材料^[14]。Primard-Brisset 等^[15]通过辐射处理的方法使携带有恢复基因的萝卜基因片段重新组合,经过筛选育成了新一代双低恢复系 R2000,从而使得甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交品种在欧洲、北美等地得到广泛应用。2009 年先锋国际良种公司通过辐射与人工选择获得了具有缩短 *Raphanus* 片段(SRF)的新的芸苔属 Ogura 恢复系^[16]。但由于这些恢复材料受到专利保护,在应用上受到限制^[17]。因此能够发现新的 Ogu CMS 恢复源并选育自主的

Ogu CMS 恢复系具有重要意义。

本研究以甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 的保持系及其恢复系 1601、SR36、SR58、1628 为材料,利用分子标记的方法验证了 4 个恢复系是否含有 *Rfo* 基因,同时与国外同类恢复系 RRH1、R113、R2000 的检测结果进行初步比较,以期为我国选育有别于国外的同类恢复材料提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 的恢复系 1601、SR36、SR58、1628,其中 1601、1628 为双低恢复系,SR58 为低芥酸恢复系;1575A 的保持系 Y107、Y120、Y240、Y636、Y680、Y684、Y691、Y696、Y782、Y787、Y801、Y824、Y870,作为对照材料;以上材料均由本课题组提供。由于缺乏受国外专利保护的恢复材料,直接将文献^[15]报道的恢复系 RRH1、R113、R2000 分子标记结果用作本研究的分子检测对照。

1.2 方 法

1.2.1 试验材料总 DNA 的提取 在大田随机挑选 4 个恢复系与 13 个保持系的单株,取其幼嫩心叶 1~2 片置于 2 mL 离心管中,然后放入装有液氮的保温杯中带回实验室。试验时取叶片用研磨棒研碎后,加入 850 μ L 抽提缓冲液(2% CTAB, 100 mmol/L Tris·Cl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 使用前加 3% 的 β -巯基乙醇, pH 8.0),之后置于 60 $^{\circ}$ C 水浴 45 min(每 10 min 振荡 1 次);然后加 850 μ L 氯仿-异戊醇(体积比 24:1)的混合液,充分振荡后在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 8 min;将上清液转移至新的离心管中,加入等体积预冷的异丙醇,颠倒混匀后置于-4 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min, 8 000 r/min 离心 15 min;弃上清,加入 200 μ L 体积分数 80% 乙醇洗涤 3 min 后, 500 r/min 离心 2 min, 倒掉乙醇自然风干,最后加 50 μ L 双蒸水溶解 DNA, 保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

参照 Primard-Brisset 等^[15]与 Hu 等^[18]的公开引物,选取 1 个基于 Ogu CMS 恢复基因设计的特异标记 BnRFO 和 5 个与恢复基因连锁的萝卜标记(ScH03、ScA14、SG34、BolJon、PGInt)对试验材料进行检测,分子标记引物序列见表 1,检测结果与 Primard-Brisset 等^[15]在文中列举的恢复系分子标记连锁图(RRH1、R113、R2000)进行比较。所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 *Rfo* 的特异标记和连锁标记的引物序列

Table 1 PCR primers for *Rfo* specific marker and five linked markers

标记名称 Marker name	引物 Primer name	序列 Sequence (5'→3')
BnRFO	BnRFO-AS2F	CATGCTTCGATCTCGTCCTTTA ^[18]
	BnRFO-AS2R	GGTAACAACATCAGGGTGGAGT ^[18]
ScH03	ScH03U	AGACGTCCACCATAACC ^[15]
	ScH03L	AGACGTCCACCATAACC ^[15]
ScA14	ScA14U	TCTGTGCTGGTGGGATGAAAG ^[15]
	ScA14L	TCTGTGCTGGCTACTTATTCATACAG ^[15]
SG34	SG34U	TATATTGTACCTTTGCCTCTTC ^[15]
	SG34L	CTTTTCTTTTAGTTTTTGGTTT ^[15]
BolJon	BolJonU	GATCCGATTCTTCTCCTGTTG ^[15]
	BolJonL	GCCTACTCCTCAAATCACTCT ^[15]
PGInt	PGIntU	CAGCACTAATCTTGCGGTATG ^[15]
	PGIntL	CAATAACCCTAAAAGCACCTG ^[15]

1.2.2 试验材料的 PCR 扩增 PCR 反应体系: Reaction Mix 5.0 μL (含 DNA Polymerase, PCR Buffer, 3 mmol/L MgCl₂ 和 400 μmol/L dNTP Mix),模板 DNA(40~50 ng/L)0.6 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.365 μL,加 PCR 专用无菌水至 10 μL。PCR 循环参数:94 ℃预变性 1 min;94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 30 s,共计 35 个循环;72 ℃延伸 10 min,然后 4 ℃保存。

引物 SG34U/SG34L 在 55 ℃的退火温度下,扩增产物出现十分模糊的非特异性条带,而将退火温度提升至 56 ℃时无非特异性条带。

1.2.3 电泳检测 将扩增产物加在 3% 琼脂糖凝胶上,置于 1% TAE 的电极缓冲液(24 W、0.5 h)中

电泳。电泳完成后,用 EB 染色 10 min,水洗后在凝胶电泳成像仪下进行观测并拍照。

2 结果与分析

2.1 *Rfo* 基因的检测

用基于 Ogu CMS 恢复基因设计的特异引物 BnRFO 对甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 的 4 个恢复系和 13 个保持系进行初步检测,结果(图 1)显示,4 个恢复系在 200~300 bp 有 1 条条带,带型与 Hu 等^[18]的一致,13 个保持系均无条带,证明甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 的 4 个恢复系均含有 Ogu CMS 的恢复基因(*Rfo*)。

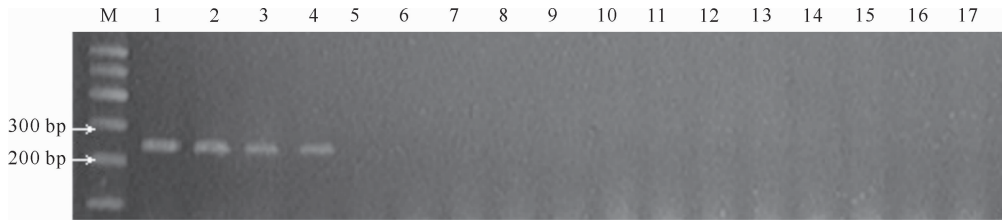


图 1 基于 Ogu CMS 恢复基因设计的特异引物 BnRFO 的 PCR 扩增结果

M. Marker;1. 恢复系 1601;2. 恢复系 SR58;3. 恢复系 SR36;4. 恢复系 1628;5~17. 保持系

Fig. 1 PCR amplification products of the marker (BnRFO) designed for Ogu CMS restoring gene

M. Marker;1. Restorer 1601;2. Restorer SR58;3. Restorer SR36;4. Restorer 1628;5-17. Maintainers

2.2 与 *Rfo* 基因连锁的萝卜标记的检测

选择 5 个与 *Rfo* 基因连锁的萝卜基因片段分子标记进一步检测,结果(图 2)表明;ScH03 标记在恢复系 SR36、SR58 中呈阳性反应,在恢复系 1601、1628 中呈阴性反应;ScA14 标记在 4 个恢复系中均呈阳性反应;SG34 标记在恢复系 SR58 中呈阴性反应,在其他 3 个恢复系中均呈阳性反应;BolJon 标记只在恢复系 SR58、SR36 中存在萝卜标记(BolJon 的 600 bp 条带);PGInt 也只在恢复系 SR36 中存

在萝卜标记(PGInt 的 950 bp 条带)。

将上述结果分别与 Primard-Brisset 等^[15]列举的 RRH1、R113、R2000 3 个恢复系的连锁标记图进行比较,结果(图 3)表明,恢复系 1601、1628 比恢复系 RRH1 缺少 3 个萝卜标记 ScH03、BolJon、PGInt,比恢复系 R113 缺少 2 个萝卜标记 BolJon、PGInt,比恢复系 R2000 缺少 1 个萝卜标记 BolJon。恢复系 SR36 与恢复系 RRH1 标记结果相同(图 3);恢复系 SR58 比恢复系 RRH1 缺少 2 个萝卜标记

SG34、PGIint,比恢复系 R113 缺少 2 个萝卜标记 SG34、PGIint 而多了 1 个萝卜标记 ScH03,比恢复系 R2000 缺少 1 个萝卜标记 SG34 而多了 1 个萝卜标记 ScH03。因标记 ScH03 与 PGIint 分别位于连

锁图的两端,推测恢复系 1601、1628、SR58 恢复基因两侧所携带的萝卜基因组片段长度短于国外恢复系 RRH1 和 R113。

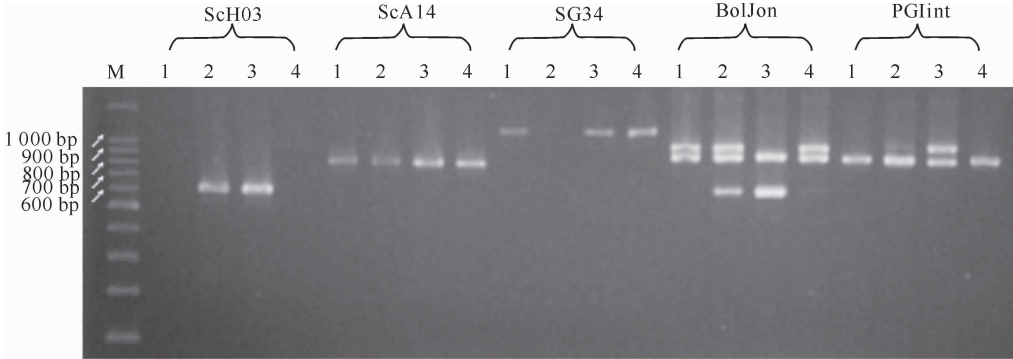


图 2 与 Ogu CMS 恢复基因连锁的标记 ScH03、ScA14、SG34、BolJon、PGIint 的 PCR 扩增结果

M. Marker;1. 恢复系 1601;2. 恢复系 SR58;3. 恢复系 SR36;4. 恢复系 1628

Fig. 2 PCR amplification products of molecular markers (ScH03,ScA14,SG34,BolJon, and PGIint) linked to Ogu CMS restoring gene

M. Marker;1. Restorer 1601;2. Restorer SR58;3. Restorer SR36;4. Restorer 1628

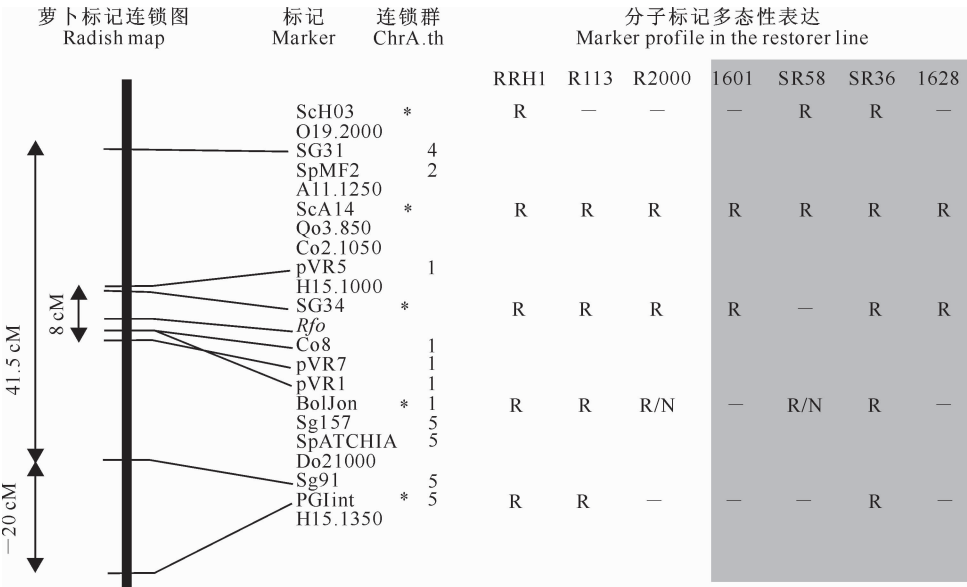


图 3 Ogu CMS 恢复基因连锁分子标记的比较

1. 白色部分 RRH1、R113、R2000 为 Primard-Brisset 等^[15]的结果;2. 灰色部分为 1601、SR58、SR36、1628 分子标记结果;
R. 包含萝卜片断;—. 不包含萝卜片断;R/N. 既包含萝卜片段又包含原来恢复系缺失的油菜片段(950 bp 条带)

Fig. 3 Comparison of molecular markers linked to Ogu CMS restoring gene

1. White part is from Primard-Brisset, et al^[15];2. Gray part is the molecular analyses of 1601,SR58,SR36, and 1628;
R. Contains the radish fragment;—. Does not contain radish fragment;R/N. Contains both a radish fragment and a *Brassica napus* fragment that was originally absent from the restorers(950 bp band)

3 结论与讨论

在油菜杂交控粉系统中,Ogu CMS 具有败育彻底、易于保持的优点。经过筛选,本课题组获得了 4 个对甘蓝型油菜 Ogu CMS 1575A 具有恢复作用的

恢复系。本研究通过基于 Ogu CMS 恢复基因 (*Rfo*)设计的特异分子标记进行检测,1601、SR58、SR36、1628 4 种恢复系均含有 Ogu CMS 的恢复基因 *Rfo*;用 5 个与恢复基因连锁的萝卜标记初步鉴定认为,恢复系 1601、1628 比恢复系 R2000 缺少 1

个萝卜标记(BolJon的600 bp条带),因此这2个恢复系的萝卜片段长度有可能小于R2000;恢复系SR58比恢复系R2000缺少1个萝卜标记SG34而多了1个萝卜标记ScH03,通过与恢复系1601、1628杂交有可能得到进一步缩短连锁的萝卜基因片段的双低恢复系。

但由于个别碱基在自然条件下会发生突变,可能造成引物无法结合,进而无法产生扩增产物。所以试验结果的进一步验证需要回收目标条带进行测序,然后在该位点处根据所测得的序列重新设计几组引物,对本课题组的4个Ogu CMS恢复系材料与国外的同类恢复系材料R2000等同时进行验证。如果结果一致,便可确定恢复系1601、1628、SR58为有别于国外同类恢复系RRH1、R113、R2000的萝卜质恢复材料。

本试验只是将本课题组选育的恢复材料与法国农艺研究院的恢复系进行初步的比较,因此不能确定本课题组提供的恢复材料是否为新的Ogu CMS恢复材料。通过试验结果只能初步判断本课题组选育的恢复系1601、1628、SR58有可能区别于国外的同类恢复系RRH1、R113、R2000。

参考文献

- [1] Ogura H. Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds [J]. Memoirs of the Faculty of Agriculture, 1968, 6(2): 39-78.
- [2] 祝朋芳,魏毓棠. Ogura胞质芸苔属作物雄性不育系的应用现状及前景 [J]. 长江蔬菜, 2004(4): 44-45.
Zhu P F, Wei Y T. Application and prospect of male sterility lines with Ogura cytoplasm in *Brassica* [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2004(4): 44-45. (in Chinese)
- [3] Desloire S, Gherbi H, Laloui W, et al. Identification of the fertility restoration locus *Rfo* in radish as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family [J]. EMBO Reports, 2003, 4(6): 588-594.
- [4] 刘后利. 油菜的遗传和育种 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 387-391.
Liu H L. The genetic and breed of rapeseed [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1985: 387-391. (in Chinese)
- [5] Hiroshi Y. Distribution and allelism of restorer genes for Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes [J]. Genes Genetic Systems, 1998, 2(73): 79-83.
- [6] Heyn F W. Transfer of restore genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus* [J]. Cruciferae Newsletter, 1976, 1: 15-16.
- [7] Jean M, Brown G G, Landry B S. Genetic mapping of nuclear fertility restorer genes for the 'Polima' cytoplasmic male sterility in canola (*Brassica napus* L.) using DNA markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95(3): 321-328.
- [8] Pellan-Delourme R. Cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.): Female fertility of restored with "Ogura" and cybrids cytoplasm [J]. Genome, 1988, 30: 234-238.
- [9] Delourme R, Bouchereau A, Hubert N, et al. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the Ogura radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88: 741-748.
- [10] Williams M E, Leemans J, Michiels F, et al. Pollen biotechnology for crop production and improvement [M]. UK: Cambridge University Press, 1997: 237-257.
- [11] Wang Z, Xiang C, Mei S. Development of PCR-based markers linked to a restorer gene for cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Euphytica, 2006, 149(1/2): 211-219.
- [12] Pinochet X, Bertrand R. Oilseed rape grain yield productivity increases with hybrid varietal types: A first balance sheet with post registration tests in France and in Europe [J]. Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 2000, 7(1): 11-16.
- [13] 刘平武,李赞,何庆彪,等. 甘蓝型油菜 pol CMS 育性恢复基因的分子标记 [J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(1): 14-19.
Liu P W, Li Y, He Q B, et al. Identification of genetic markers for the pol CMS restorer gene in *Brassica napus* L. [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29(1): 14-19. (in Chinese)
- [14] 辛根塔参与股份公司. Ogura胞质雄性不育芸苔属植物的改良的育性恢复方法: 中国, 200580003519. 4 [P]. 2007-02-14.
Syngenta Participations AG. Fertility resoration for Ogura cytoplasmic male sterile *Brassica* and method: China, 200580003519. 4 [P]. 2007-02-14. (in Chinese)
- [15] Primard-Brisset C, Poupard J P, Horvais R, et al. A new recombined double low restorer line for the Ogu-INRA-CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111: 736-746.
- [16] 先锋国际良种公司. 具有缩短的 *Raphanus* 片段(SRF)的新的芸苔属 *Ogura* 恢复系: 中国, 200980109801. 9 [P]. 2011-06-01.
Pioneer High-Bred International, INC. *Raphanus* fragment reduction in SRF lines: China, 200980109801. 9 [P]. 2011-06-01. (in Chinese)
- [17] 陈卫江,李莓,王同华,等. 甘蓝型油菜萝卜细胞质雄性不育恢复材料的创制 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(8): 1465-1474.
Chen W J, Li M, Wang T H, et al. Creative process of a new restorer material with Ogu CMS in *Brassica napus* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(8): 1465-1474. (in Chinese)
- [18] Hu X Y, Sullivan-Gibert M, Kubit T, et al. Mapping of the Ogura fertility restorer gene *Rfo* and development of *Rfo* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.) [J]. Molecular Breeding, 2008, 22: 663-674.