

网络出版时间:2014-06-21 18:03

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.020

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.020.html

白菜细胞质雄性不育的恢保关系与分子鉴定

王国芳,张鲁刚,李冬霞

(西北农林科技大学 园艺学院,农业部西北地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】明确白菜细胞质雄性不育类型、恢保关系及其多样性。【方法】采用遗传学方法和已报道的 5 个不育细胞质 orf138、orf222、orf224、orf263 和 orf288 的特异引物的分子鉴定方法,对 8 种大白菜雄性不育材料(CMS3411-7、CMS7311、00S54-m-1、00S54-m-2、12XC4、00S11-1、00S11-3 和 00S11-8)进行鉴定。【结果】恢保关系分析表明,Pol CMS 的恢复系和保持系对于 Ogu 类型(12XC4)及 Ogu 和 Nap 综合类型(00S54-m-1、00S54-m-2、00S11-1、00S11-3 和 00S11-8)雄性不育(简称 Ogu-Nap CMS)均表现为保持系。分子鉴定表明,8 份白菜雄性不育材料中有 2 份的细胞质属于 Pol 型甘蓝型油菜不育类型,1 份属于 Ogu 型萝卜不育类型,5 份材料的细胞质为 Ogu-Nap CMS 不育胞质综合类型,没有芥菜不育细胞质。细胞质多样性分析结果表明,5 份 Ogu-Nap 型甘蓝型不育胞质综合类型的细胞质雄性不育材料中,1 份材料(00S54-m-1)在 BnTR4 位点存在变异。【结论】明确了白菜细胞质雄性不育类型、恢保关系及其细胞质多样性。

【关键词】 大白菜;细胞质雄性不育;恢保关系;分子鉴定

【中图分类号】 S634.103.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)07-0183-08

Restoring and maintaining relationship and molecular identification of cytoplasmic male sterility in Chinese cabbage

WANG Guo-fang, ZHANG Lu-gang, LI Dong-xia

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation in Northwest China,
Ministry of Agriculture, College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The aim of this study was to clarify the sterile type, restoring and maintaining relationship, and diversity of cytoplasmic male sterility in Chinese cabbage. 【Method】 Genetic and molecular methods with special primers of the reported 5 sterile cytoplasm, orf138, orf222, orf224, orf263 and orf288, were used to identify the cytoplasmic male sterility of eight Chinese cabbages (CMS3411-7, CMS7311, 00S54-m-1, 00S54-m-2, 12XC4, 00S11-1, 00S11-3, and 00S11-8). 【Result】 Both restorer and maintainer of Pol CMS acted as maintainer for Ogu CMS (12XC4) and comprehensive Ogu-Nap CMS (00S54-m-1, 00S54-m-2, 00S11-1, 00S11-3, and 00S11-8). Molecular identification showed that two CMS materials belonged to Pol CMS type, one CMS material belonged to the Ogu CMS type and five CMS materials belonged to Ogu-Nap CMS type. There was no Brassica juncea CMS type. Analysis on cytoplasmic diversity showed that one out of the five Ogu-Nap CMS (00S54-m-1) had variation at BnTR4 site. 【Conclusion】 The sterile type, restoring and maintaining relationship and cytoplasmic diversity of eight CMS in Chinese cabbages were determined.

【收稿日期】 2013-05-10

【基金项目】 国家自然科学基金项目(30871717);国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01);陕西省科技统筹创新工程计划项目

【作者简介】 王国芳(1985—),女,河北石家庄人,在读硕士,主要从事蔬菜育种与生物技术研究。

E-mail: wangguofang332@163.com

【通信作者】 张鲁刚(1963—),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事白菜育种与生物技术研究。E-mail: lugangzh@163.com

Key words: heading Chinese cabbage; CMS; restoring and maintaining relationship; molecular identification

大白菜 (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson) 属于十字花科芸薹属芸薹种的白菜亚种, 又名结球白菜, 原产地为中国^[1]。大白菜的杂种一代具有显著的杂种优势^[2], 生产杂种一代的主要材料有自交不亲和系和雄性不育系^[3-4]。利用自交不亲和系生产杂种一代有许多缺点, 例如亲本连续自交多代, 极易发生退化, 且人工剥蕾的成本高, 投资大^[4], 而采用雄性不育系配制杂交种, 不仅操作方便、成本低, 而且杂交率高, 杂种的纯度高, 是目前较为理想的杂种一代制种方式^[5]。雄性不育分为细胞核基因控制的细胞核雄性不育、细胞质基因控制的细胞质雄性不育和核质共同控制的核质互作雄性不育 3 种类型^[6-7]。

细胞质雄性不育存在于 300 多种高等植物中, 是植物杂种优势利用的理想方式。白菜细胞质雄性不育的选育及利用始于 20 世纪 70 年代末, 但由于至今没有直接在白菜上发现细胞质雄性不育, 因此白菜细胞质雄性不育主要来自异源植物, 如甘蓝型油菜、萝卜等。本研究室最早将 Pol CMS 的细胞质成功导入到大白菜中, 创造出大白菜细胞质雄性不育系^[8], 并育成“秦白 4 号”等大白菜^[9]。励启腾等^[10]利用甘蓝型油菜胞质雄性不育材料作为母本, 以大白菜自交可育系作为父本, 将甘蓝型油菜胞质雄性不育材料转育为大白菜胞质雄性不育系。Ogu CMS 是由 Ogura 在 1968 年从一个萝卜品种的留种田中发现的不育株经过选育而成的^[11], 它的雄性器官完全败育, 不育度可达到 100%, 是迄今为止十字花科作物中不育性最彻底的胞质不育源之一, 具有很大的研究价值^[12-14]。但是, 当国内外学者将其转入白菜、甘蓝、花椰菜等作物中时, 出现了低温时黄化、蜜腺小或不明显等问题^[15]。目前国内外学者采用不同的途径和方法对其进行了改良^[16-18], 已经育成了改良的不育系, 并在大白菜中应用^[19], 但蜜腺退化现象仍然很明显。

近年来, 芥菜型油菜雄性不育也被作为雄性不育材料转育白菜^[20]。史华清等^[21]经过几年的研究, 育成了芥菜型“三系”。芥菜的三系配套, 填补了育种史上利用芥菜杂种优势进行育种的空白, 推动了芥菜型油菜雄性不育的发展。

不同细胞质雄性不育的机理不同, 在遗传上表现为恢保关系不同, 在分子水平上表现为不育基因

不同。研究表明, *orf138*, *orf222*, *orf224* 和 *orf263*、*orf288* 分别为 Ogu 型萝卜、Nap 型甘蓝型油菜、Pol 型甘蓝型油菜和芥菜细胞质不育类型的细胞质基因^[22]。

本试验在前人研究的基础上, 利用已知细胞质雄性不育的特异引物及十字花科其他细胞质基因进行 PCR 扩增和特异扩增产物序列比对, 结合用已知 CMS3411-7 的恢复材料及其保持材料与不育材料测交, 进行大田雄蕊育性观察鉴定, 对本课题组收集、选育的雄性不育材料进行鉴定分析, 以期为大白菜种质资源的创新及利用雄性不育进行育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验鉴定的 8 种雄性不育材料分别为 CMS3411-7、CMS7311、00S54-m-1、00S54-m-2、12XC4、00S11-1、00S11-3 和 00S11-8, 其中 CMS3411-7、CMS7311 是本课题组培育的细胞质雄性不育材料, 00S54-m-1 和 00S54-m-2 是 2012 年在 00S54-m 扩繁棚中发现的不育株, 12XC4、00S11-1、00S11-3、00S11-8 分别是在引进材料中发现的不育株。用 CMS3411-7、CMS7311 的恢复系 88S148、92S105、00S109^[23] 及保持系 11J22、00S54-m、08S841 分别与新育成的雄性不育材料配置测交一代(表 1)。每个雄性不育材料选取 1 个测交一代, 进行细胞质分子鉴定, 同时在花期观察测交一代的雄蕊育性 3 次。试验材料种植在西北农林科技大学杨凌蔬菜试验站。

1.2 方法

1.2.1 材料的种植及 DNA 提取 育苗前先进行浸种催芽, 待种子露白时育苗。当幼苗长至 6~7 片真叶时, 将其移栽到大田中。缓苗后, CMS3411-7、CMS7311 及各雄性不育材料的 1 个测交一代(分别是 12CF33、12CF36、12CF42、12CF74、12CF78、12CF83)各选 3~5 个单株, 取叶样。

采样时, 先将 2 mL 的离心管灭菌, 用镊子采取 0.2 g 左右的叶片放入离心管中, 将离心管放入 -80℃ 冰箱中冷冻。采用改良的 CTAB 法^[24] 提取样品 DNA, 用 ddH₂O 将 DNA 稀释至 50 ng/μL 备用。

1.2.2 引物选择 选用已知的 5 对细胞质雄性不

育引物(表 2)及 11 个十字花科其他细胞质基因的公司合成。
引物(表 3)进行试验。所有引物均由上海生物工程

表 1 大白菜细胞质雄性不育测交一代编号

不育材料 Sterile materials	Pol CMS 恢复材料 Restoring materials of Pol CMS			Pol CMS 保持材料 Maintaining materials of Pol CMS		
	88S148	92S105	00S109	11J22	00S54-m	08S841
00S54-m-1	12CF32	12CF33	12CF34	12CF35	12CF51	
00S54-m-2	12CF37	12CF38	12CF39	12CF36	12CF50	
12XC4	12CF41	12CF42	12CF40, 12CF43			
00S11-1	12CF75	12CF74	12CF76	12CF77		
00S11-3	12CF79	12CF80	12CF81			12CF78
00S11-8	12CF84	12CF85				12CF83

表 2 鉴定大白菜细胞质雄性不育的特异引物

Table 2 Special primers for identifying the cytoplasmic male sterility in Chinese cabbage				
引物 Primer name	正向引物(5'→3') Forword primer(5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer(5'→3')	不育类型 Sterile type	文献 References
orf138	CCATATTTGGCTAAGCTGGTTTTCT	TATCATCTCGGTCCATTGTCCAC	Ogu CMS	[3,25]
orf222	ATGCCTCAACTGGATAAAATTCACTT	TCATCGAAATAGATCRAGKATYTC	Nap CMS	[25]
orf224	AAATCGATGCCTCAACTGGATAAATTC	CCCAAGCTTCAGCGAAAGAGATCAAGGAT	Pol CMS	[3]
orf263	ATGAAAAATAGACTCCAA	TCAGTCTAGATAATGCCG	Tour CMS	[3]
orf288	CAATGGCTATTACCCTGCT	AGCGAGCTGTTCCGAAGTTT	Hau CMS	[3]

表 3 鉴定大白菜细胞质多态性的引物

Table 3 Primers for identifying the cytoplasmic diversity of Chinese cabbage			
引物 Primer name	正向引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer(5'→3')	文献 References
MF2	GGTTCGTCGTTCCCATCGC	CATAATAATTAGATAAAATCTGTTCC	[26-27]
MF4	CGGATCTATTATGACATATCC	GAAATATGAATACACTAGATTAGG	[26-27]
MF7	CGGCAGGAGTCATTGGTTCAAA	GATTTTGTAACTAGCTGACG	[26-27]
MF8	CTTATATTCATAAGCGAAGAAC	AATAACAATAGATGAATAGTCA	[26-27]
Chloro35	TGGAAAAGGGGAGTTGTCCG	GAATATTACTCTCGAACAGAC	[28-29]
Chloro39	CATGAATTAGTAACTGCATCC	TCCTATTCATGGGGATTCCG	[28-29]
Chloro H	GCTTCTTCCCCTGTGCCTCC	AGTGCAGCCTTAGATGCTTC	[27]
ccmp2	GATCCCGGACGTAATCCTG	ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	[27,29]
ccmp3	CAGACCAAAAGCTGACATAG	GTTTCATTTCGGCTCCTTTAT	[27,29]
BnTR1	CCGTTAGGGGTATTTAGTAACTCG	ACATAATGGCAATGTATCGGACTG	[29]
BnTR4	GAAGTCCGAGGACCTTTAGTACC	AGTAAGTTGTAGGTAGGGGCTTCAT	[29]

1.2.3 PCR 扩增与产物检测 利用 premix 进行 PCR 扩增,反应体系为 10 μL,其中包括 premix 5 μL,ddH₂O 3 μL,正、反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,模板 DNA 1 μL。PCR 反应程序为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 38 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min^[3]。取 6 μL 的扩增产物在 10 g/L 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测(电压 130 V,电流 130 mA,电泳缓冲液为 1×TAE),以 Marker 2000 作为分子量标准,在紫外投影仪上观察并拍照。

1.2.4 PCR 产物的回收与测序 采用天根生化科技有限公司生产的试剂盒对 PCR 产物进行回收后送该公司测序,将测序所得的结果在 NCBI 上进行比对及序列分析。

1.2.5 大白菜细胞质雄性不育测交一代田间育性的统计观察 在大白菜植株开花后,通过 3 次田间育性统计观察^[30]分析其恢保关系,明确其雄性不育类型。

1.2.6 大白菜细胞质雄性不育测交一代花器官形态的观察 调查供试材料花器官的各个形态指标^[31],主要包括花蕾长、花蕾粗、花瓣长、雄蕊长、花药形状、蜜腺数量及大小等,每份材料统计 10 株,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 大白菜细胞质雄性不育测交一代的恢保关系

24 份大白菜细胞质雄性不育测交一代开花期雄蕊育性的统计观察结果(表 4)表明,Pol CMS 恢

复材料和 Pol CMS 保持材料与 6 份不育材料
00S54-m-1、00S54-m-2、12XC4、00S11-1、00S11-3、
00S11-8 的测交一代均表现为全不育,而且不育性

彻底,初步说明这 6 个不育材料与 Pol CMS 的恢保
关系不同,不属于 Pol CMS 类型,但这 6 个不育材
料的细胞质是否相同,有待进一步研究。

表 4 大白菜细胞质雄性不育的恢保关系鉴定

Table 4 Identification of restoring and maintaining relationship of cytoplasmic male sterility in Chinese cabbage						
不育材料 Sterile materials	Pol CMS 恢复材料 Restoring materials of Pol CMS			Pol CMS 保持材料 Maintaining materials of Pol CMS		
	88S148	92S105	00S109	11J22	00S54-m	08S841
00S54-m-1	S,花丝长 Long filament	S,花丝长 Long filament	S,花丝短 Short filament		S,花丝长 Long filament	
00S54-m-2	S,花小 Small flower	S,败蕾重 Heavy aborted bud	S,有败蕾 aborted bud	S,花丝长 Long filament	S,花丝长 Long filament	
12XC4	S,花丝短 Short filament	S,花丝短 Short filament	S,败蕾重 Heavy aborted bud			
00S11-1	S,花丝长 Long filament	S,花丝短 Short filament	S,花丝长 Long filament	S,花丝长 Long filament		
00S11-3	S,花丝长 Long filament	S,花丝长/短 Long/short filament	S,花丝短 Short filament			S,花丝长 Long filament
00S11-8	S,花丝长 Long filament	S,花丝长 Long filament		S,花丝长 Long filament		S,花丝长 Long filament

注:S. 雄性不育。
Note:S. Male sterility.

2.2 大白菜不同细胞质雄性不育测交后代的花器
官形态

CMS3411-7 和 CMS7311 属于 Pol 型甘蓝型油
菜不育类型,其共同特点是:雌蕊较长,雄蕊较短,雄

蕊与雌蕊的比值较小,其蜜腺为 4 个,且蜜腺大小均
正常。大白菜细胞质雄性不育测交一代的花器官形
态见表 5。

表 5 大白菜细胞质雄性不育测交一代的花器官形态

Table 5 Floral morphology of hybrids crossed by cytoplasmic male sterility in Chinese cabbage											
恢复系 Restoring lines	不育源 Sterile source	编号 Number	花蕾长 Bud length	花蕾粗 Bud diameter	花瓣长 Petal length	雌蕊长 Pistil length	长雄蕊长 Long stamens length	短雄蕊长 Short stamens length	花药 形状 Anther shape	蜜腺 数量 Nectary number	蜜腺 大小 Nectary size
88S148	00S54-m-1	12CF32	0.52	0.24	0.84	0.64	0.55	0.34	△	4	小 Small
	00S54-m-2	12CF37	0.43	0.22	0.79	0.60	0.35	0.23	△	4	小 Small
	12XC4	12CF41	0.55	0.25	0.86	0.62	0.36	0.24	△	4	小 Small
	00S11-1	12CF75	0.44	0.20	0.75	0.52	0.51	0.34	△	4	小 Small
	00S11-3	12CF79	0.48	0.24	0.86	0.65	0.54	0.40	△	4	小 Small
	00S11-8	12CF84	0.50	0.20	0.83	0.67	0.50	0.37	△	4	小 Small
92S105	00S54-m-1	12CF33	0.56	0.24	0.98	0.68	0.52	0.38	△	4	小 Small
	00S54-m-2	12CF38	0.46	0.23	0.85	0.70	0.58	0.38	△	4	小 Small
	12XC4	12CF42	0.46	0.24	0.78	0.65	0.36	0.26	△	4	小 Small
	00S11-1	12CF74	0.48	0.23	0.84	0.63	0.49	0.28	△	4	小 Small
	00S11-3	12CF80	0.42	0.21	0.99	0.84	0.55	0.41	△	4	小 Small
	00S11-8	12CF85	0.46	0.21	0.82	0.59	0.53	0.33	△	4	小 Small
00S109	00S54-m-1	12CF34	0.47	0.22	0.76	0.56	0.34	0.28	△	4	小 Small
	00S54-m-2	12CF39	0.44	0.23	0.78	0.58	0.48	0.24	△	4	小 Small
	12XC4	12CF40	0.50	0.22	0.89	0.62	0.40	0.27	△	4	小 Small
	00S11-1	12CF76	0.53	0.24	0.90	0.65	0.51	0.41	△	4	正常 Normal
	00S11-3	12CF81	0.49	0.22	0.90	0.71	0.52	0.44	△	4	小 Small

注:△表示花药形状为三角形。
Note:△ represents the shape of anther is triangle.

由表 5 可知,大白菜不同细胞质雄性不育测交
后代的花器官形态差异性极为显著,00S54-m-1、
00S54-m-2、12XC4、00S11-1、00S11-3、00S11-8 测交
后代的共同特点是蜜腺小。由表 5 可知,用 3 个 Pol
CMS 恢复材料 88S148、92S105 和 00S109 作为共同

测交亲本,相同测交亲本测交后代的花蕾长、花蕾
粗、花瓣长、雌蕊长、长雄蕊长、短雄蕊长存在很大差
异,特别是在雄蕊长度方面,12XC4 的 3 个测交后代
的雄蕊长度明显短,92S105 对 00S11-1 的测交后
代、00S109 对 00S54-m-1 的测交后代雄蕊也较短;

另外,92S105 和 00S109 对 00S54-m-2 的测交后代出现败蕾现象。由此可见,12XC4 可能不同于 00S54-m-1、00S54-m-2、00S11-1、00S11-3、00S11-8, 00S54-m-1、00S54-m-2、00S11-1 较 00S11-3、00S11-8 有一定细胞质变异。

2.3 细胞质雄性不育特异引物对供试大白菜雄性不育材料的 PCR 扩增

利用 5 对已知的细胞质雄性不育特异引物,对 8 个不同来源的大白菜雄性不育材料进行 PCR 扩增,其中引物 orf263 和 orf288 从 8 个材料中均未扩增出产物,而引物 orf138、orf222 和 orf224 均扩增出特异性的产物(图 1,表 6)),其中 orf224 从 CMS3411-7 和 CMS7311 中扩增出长度约 700 bp 的片段,测序结果与 orf224 序列一致性在 99%以上;

orf138 和 orf222 没有从 CMS3411-7、CMS7311 中扩增出特异性产物,证明 CMS3411-7 和 CMS7311 的不育细胞质基因具有 Pol CMS 细胞质的特征。orf138 引物仅从 12XC4 中扩增出大约 300 bp 的条带,测序结果与 orf138 序列一致性为 99%,提示 12XC4 应该属于 Ogu 细胞质;orf138 和 orf222 从 00S54-m-1、00S54-m-2、00S11-1、00S11-3、00S11-8 中同时扩增出约 300 和 700 bp 的条带,测序结果分别与 orf138 和 orf222 的序列一致性为 99%,说明这些材料不是单一的 Ogu CMS 或者 Nap CMS 类型,而是同时具有 Ogu CMS 和 Nap CMS 细胞质特征,简称 Ogu-Nap CMS。这一结果与雄蕊长短及蜜腺大小结果相一致。

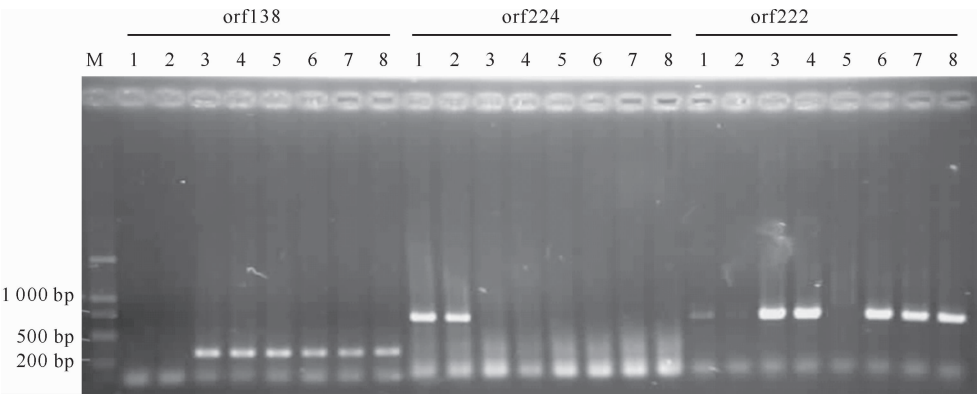


图 1 3 对细胞质雄性不育引物对 8 种大白菜雄性不育材料扩增产物的凝胶电泳结果
1~8 分别是 CMS3411-7、CMS7311、12CF33、12CF36、12CF42、12CF74、12CF78、12CF83

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of products amplified by three pairs of CMS primers for male sterility in eight Chinese cabbage types
1—8 are CMS3411-7, CMS7311, 12CF33, 12CF36, 12CF42, 12CF74, 12CF78, and 12CF83, respectively

表 6 白菜细胞质雄性不育材料不育基因扩增产物的比较

Table 6 Comparison of products amplified by CMS gene in CMS materials

材料 Materials	扩增引物 Amplifying primer	扩增产物大小/bp Size of amplifying products	比对结果/% Comparison results
CMS3411-7	orf224	669	99
CMS7311	orf224	659	100
00S54-m-1	orf138	276	99
	orf222	647	99
00S54-m-2	orf138	281	99
	orf222	644	99
12XC4	orf138	280	99
00S11-1	orf138	279	99
	orf222	644	99
00S11-3	orf138	280	99
	orf222	650	99
00S11-8	orf138	279	99
	orf222	653	99

2.4 大白菜雄性不育材料细胞质其他基因的鉴定
为了进一步了解大白菜不同雄性不育材料细胞

质的变异,选择十字花科 2 个线粒体基因和 9 个叶绿体基因引物(表 3)对其进行分子鉴定,结果表明,

线粒体的 BnTR4 引物扩增出 3 种带型,CMS3411-7 和 CMS7311 扩增出长度约 220 bp 的片段,与大白菜带型相同;00S54-m-1 扩增出 400 bp 的片段;00S54-m-2、12XC4、00S11-1、00S11-3、00S11-8 扩增出相同长度(350 bp)的条带,与大白菜材料带型不同(图 2)。ccmp3 从 CMS3411-7 和 CMS7311 中扩增出长度约为 70 bp 的片段,与大白菜带型相同,从其他雄性不育材料中扩增出相似的带型,与大白菜材料带型不同。MF4、MF7 从 CMS3411-7 和 CMS7311 中扩增出与大白菜不同的带型;从其他雄性不育材料中扩增出相似的带型(125 bp),与大白菜材料带型相同。BnTR1 从所有雄性不育材料中

扩增出相似的带型,但与大白菜材料带型不同,可能反映了大白菜细胞质与异源细胞质的差异;Chloro H、MF8、ccmp2、Chloro35、Chloro39 等从所有雄性不育材料中扩增出相似的带型,且与大白菜带型相同。由此说明,CMS3411-7 和 CMS7311 的细胞质归为一类,更接近大白菜细胞质;00S54-m-2、12XC4、00S11-1、00S11-3、00S11-85 的细胞质在检测的基因位点上没有差异,说明 Ogu CMS 与 Ogu-Nap CMS 差异较小;00S54-m-1 在 BnTR4 基因上与 0S54-m-2、00S11-1、00S11-3、00S11-8 材料不同,说明 Ogu-Nap CMS 内部存在变异。

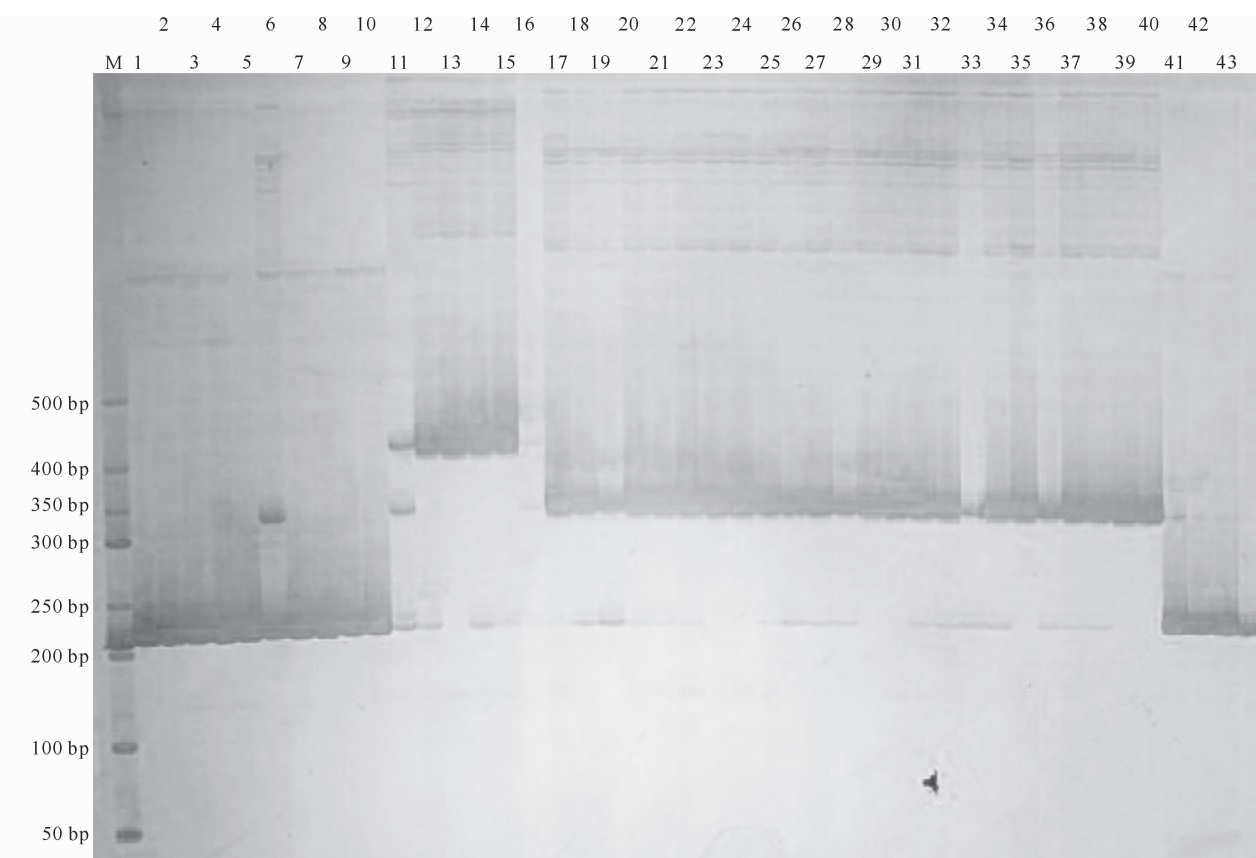


图 2 引物 BnTR4 对 8 种大白菜雄性不育材料扩增产物的凝胶电泳结果

M. DNA Marker;1~5. CMS3411-7 细胞质;6~10. CMS7311 细胞质;11~15. 00S54-m-1 细胞质;16~20. 00S54-m-2 细胞质;21~25. 12XC4 细胞质;26~30. 00S11-1 细胞质;31~35. 00S11-3 细胞质;36~40. 00S11-8 细胞质;41~43. 普通大白菜细胞质

Fig. 2 Eelectrophoresis pattern of products amplified by primer BnTR4 for 8 male sterility in heading Chinese cabbage

M. DNA Marker;1—5. The cytoplasm of CMS3411-7;6—10. The cytoplasm of CMS7311;11—15. The cytoplasm of 00S54-m-1;16—20. The cytoplasm of 00S54-m-2;21—25. The cytoplasm of 12XC4;26—30. The cytoplasm of 00S11-1;31—35. The cytoplasm of 00S11-3;36—40. The cytoplasm of 00S11-8;41—43. The cytoplasm of common Chinese cabbage

3 讨 论

利用细胞质雄性不育进行制种,克服了人工剥离授粉的高成本性和复杂性,投资少,效益高,其杂交率不受环境条件的影响^[32],与其他育种方式相

比,是一种低投入、高效率的育种方式。近 20 年来,国内外学者在十字花科作物上已发现了多种来源不同的细胞质雄性不育类型,而白菜细胞质雄性不育主要来源于异源不育细胞质,丰富细胞质来源是防止遗传脆弱性的重要途径。以往判断雄性不育细胞

质的异同主要根据恢保关系确定,其结果有一定的局限性,现代分子生物学提供了从分子水平鉴定细胞质多样性的技术。本研究根据已知细胞质雄性不育基因的分子标记和十字花科叶绿体、线粒体的有关基因,对8个雄性不育材料进行鉴定,一方面验证了恢保关系分析结果的正确性,同时发现在相同的恢保关系下,存在不育基因的多样性;在相同不育基因背景下,存在细胞质其他基因的多样性,这些结果为合理利用这些雄性不育材料提供了依据,也为新型细胞质雄性不育的鉴定提供了参考。

[参考文献]

- [1] 卢玉华. 蔬菜栽培学各论 [M]. 北京:中国农业出版社,2000.
Lu Y H. The theory of vegetable cultivation [M]. Beijing:China Agriculture Press,2000. (in Chinese)
- [2] 张德双,徐家炳,曹鸣庆,等. 大白菜转育新型甘蓝型油菜细胞质雄性不育系的研究 [J]. 华北农学报,2002,17(1):60-63.
Zhang D S,Xu J B,Cao M Q,et al. Study of new type cytoplasmic male sterile on Chinese cabbage transferred from CMS 96 [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2002,17(1):60-63. (in Chinese)
- [3] 施展,万正杰,徐跃进,等. 大白菜 hau 胞质雄性不育系的鉴定及不育相关基因结构分析 [J]. 园艺学报,2012,39(3):469-476.
Shi Z,Wan Z J,Xu Y J,et al. Characterization of the Chinese cabbage hau cytoplasmic male-sterile line and sequence analysis of the fertility-related gene [J]. Acta Horticulturae Sinica,2012,39(3):469-476. (in Chinese)
- [4] 刘玉梅,方智远,孙培田,等. 十字花科作物雄性不育性获得的主要途径及其利用 [J]. 中国蔬菜,2002(2):52-55.
Liu Y M,Fang Z Y,Sun P T,et al. The main way and its use of male sterility in cruciferous crops [J]. China Vegetables,2002(2):52-55. (in Chinese)
- [5] Zhang L,Yasumoto K,Yamagishi H. Identification of cytoplasmic male sterility in Chinese radish following PCR analysis of mitochondrial DNA [J]. Plant Mol Biol Rep,2012,30:817-826.
- [6] 夏广清,何启伟. 大白菜雄性不育及其机理的研究进展 [J]. 山东农业科学,2004(6):73-76.
Xia G Q,He Q W. The progress of male sterility and its mechanism in Chinese cabbage [J]. Shandong Agricultural Sciences,2004(6):73-76. (in Chinese)
- [7] 孙日飞,钮心恪,司家钢,等. 新型萝卜胞质白菜雄性不育系研究初报 [J]. 中国蔬菜,1997(4):32-33.
Sun R F,Niu X K,Si J G,et al. Preliminary study of the new Ogura CMS cabbage male sterile [J]. China Vegetables,1997(4):32-33. (in Chinese)
- [8] 柯桂兰,赵雅雅,宋胭脂,等. 大白菜异源胞质雄性不育系 CMS3411-7 的选育及应用 [J]. 园艺学报,1992,19(4):333-340.
Ke G L,Zhao Z Y,Song Y Z,et al. The breeding and application of allocytoplasmic male sterile CMS3411-7 in Chinese cabbage [J]. Acta Horticulturae Sinica,1992,19(4):333-340. (in Chinese)
- [9] 柯桂兰,赵雅雅,宋胭脂,等. 秦白4号大白菜的选育 [J]. 陕西农业科学,1996(4):12-14.
Ke G L,Zhao Z Y,Song Y Z,et al. The breeding of Chinese cabbage Qinbei No. 4 [J]. Journal of Shaanxi Agricultural Sciences,1996(4):12-14. (in Chinese)
- [10] 励启腾,孟平红,吴跃勇. 大白菜细胞质雄性不育系的选育 [J]. 贵州农业科学,1995(3):1-4.
Li Q T,Meng P H,Wu Y Y. The breeding of cytoplasmic male sterile in Chinese cabbage [J]. Guizhou Agricultural Sciences,1995(3):1-4. (in Chinese)
- [11] 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.
- [12] 张明龙,章徐鸯,林宝刚,等. 国内外油菜细胞质雄性不育(CMS)系统的研究进展 [J]. 黑龙江农业科学,2004(1):36-38.
Zhang M L,Zhang X Y,Lin B G,et al. The research progress on cytoplasmic male-sterility system(CMS) in rapeseed in the world [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences,2004(1):36-38. (in Chinese)
- [13] 侯喜林,曹寿椿,吴志行. 十字花科作物几种主要细胞质雄性不育类型及其利用(上) [J]. 长江蔬菜,1999(5):1-3.
Hou X L,Cao S C,Wu Z X. The types and utilization of cytoplasmic male sterility in several cruciferous crops [J]. Changjiang Vegetables,1999(5):1-3. (in Chinese)
- [14] 李桂花,张衍荣,曹健,等. 雄性不育在十字花科蔬菜中的研究进展 [J]. 江西农业大学学报,2003,25(2):181-186.
Li G H,Zhang Y R,Cao J,et al. Application of heterosis of male sterility on cruciferous vegetables [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2003,25(2):181-186. (in Chinese)
- [15] Williams P H,Heyn F W. The origin and development of cytoplasmic male sterile Chinese cabbage [C]//Chinese Cabbage,Proceeding of the first international symposium. Taiwan:Asian Vegetable Research and Development Center,1981:293-300.
- [16] 傅廷栋,杨光圣,杨小牛,等. 甘蓝型油菜波里马细胞质雄性不育的发现、研究与利用 [J]. 自然科学进展:国家重点实验室通讯,1995,5(3):287-293.
Fu T D,Yang G S,Yang X N,et al. The discovery, research and utilization of polima Cytoplasmic male sterile in *Brassica napus* [J]. Progress in Natural Science:State Key Laboratory of Communication,1995,5(3):287-293. (in Chinese)
- [17] 朱玉英,姚文岳,张素琴,等. Ogura 细胞质甘蓝雄性不育系选育及其利用 [J]. 上海农业学报,1988,14(2):19-24.
Zhu Y Y,Yao W Y,Zhang S Q,et al. Breeding and utilization of male sterile lines with ogura cytoplasm in cabbage [J]. Acta Agrieulturae Shanghai,1988,14(2):19-24. (in Chinese)

- [18] Robertson D, Earle J D P, Mutschler M A. Analysis of organelle genomes in a somatic hybrid derived from cytoplasmic male-sterile *Brassica oleracea* and atrazine-resistant *B. campestris* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1987, 74(3): 303-309.
- [19] 张德双, 张凤兰, 徐家炳. 大白菜 CMS96 细胞质雄性不育系的特点分析 [J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 59-62.
Zhang D S, Zhang F L, Xu J B. Characteristics of Chinese cabbage cytoplasmic male sterile CMS96 [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2005, 20(1): 59-62. (in Chinese)
- [20] 万正杰, 王显军, 傅廷栋, 等. 芥菜型油菜细胞质雄性不育系 6-102A 的细胞学观察 [J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(3): 268-271.
Wan Z J, Wang X J, Fu T D, et al. The cytological observation of cytoplasmic male sterile line in *Brassica juncea* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2006, 28(3): 268-271. (in Chinese)
- [21] 史华清, 龚瑞芳, 庄丽莲, 等. 芥菜型油菜 (*Brassica Juncea*) 杂种优势利用的研究 [J]. 作物学报, 1991, 17(1): 32-40.
Shi H Q, Gong R F, Zhuang L L, et al. Studies on the utilization of Heterosis in mustard [J]. Acta Agronomica Sinica, 1991, 17(1): 32-40. (in Chinese)
- [22] 吉立柱, 孙德岭, 孙立全. 十字花科细胞质雄性不育的类型及机理 [J]. 江苏农业科学, 2007(3): 106-110.
Ji L Z, Sun D L, Sun L Q. The type and mechanism of cytoplasmic male sterility in cruciferous vegetables [J]. Journal of Jiangsu Agricultural Sciences, 2007(3): 106-110. (in Chinese)
- [23] 张鲁刚, 柯桂兰. 大白菜异源胞质雄性不育遗传规律及其恢复性的研究 [J]. 西北农业学报, 1994, 3(3): 45-50.
Zhang L G, Ke G L. The genetic law and restoration of allo-cytoplasmic male sterility in Chinese cabbage [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalls Sinica, 1994, 3(3): 45-50. (in Chinese)
- [24] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法 [J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16.
Li R H, Xia Y S, Liu S Z, et al. The improved method of plant DNA extracting [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2009, 28(9): 14-16. (in Chinese)
- [25] 李建斌, 张海娟, 余小林, 等. 结球甘蓝细胞质雄性不育 (CMS) 类型的分子鉴定 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(6): 1149-1153.
Li J B, Zhang H J, Yu X L, et al. Molecular identification of the cytoplasmic male sterile (CMS) type in common head cabbage [J]. Molecular Plant Breeding, 2009, 7(6): 1149-1153. (in Chinese)
- [26] Flannery M L, Mitchell F J G, Coyne S, et al. Plastid genome characterization in *Brassica* and *Brassicaceae* using a new set of nine SSRs [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113: 1221-1231.
- [27] 许 颢, 陆光远, 伍晓明, 等. 欧洲野生甘蓝的核质遗传多样性和群体遗传结构分析 [J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(2): 111-117.
Xu K, Lu G Y, Wu X M, et al. Nuclear-cytoplasmic diversity and population structure of European wild *Brassica oleracea* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(2): 111-117. (in Chinese)
- [28] Allender C J, Allainguillaume J, Lynn J, et al. Simpl sequence repeats reveal uneven distribution of genetic diversity in chloroplast genomes of *Brassica oleracea* L. and ($n=9$) wild relatives [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114: 609-618.
- [29] 张瑞杰, 田 蓉, 闫晋强, 等. 甘蓝种和芥菜型油菜细胞质的遗传多样性 [J]. 西北农业学报, 2012, 21(10): 59-64.
Zhang R J, Tian R, Yan J Q, et al. Cytoplasmic diversity of *Brassica oleracea* and *Brassica* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalls Sinica, 2012, 21(10): 59-64. (in Chinese)
- [30] 柯桂兰, 张鲁刚. 大白菜异源胞质雄性不育恢保关系的研究 [J]. 西北农业学报, 1993, 2(1): 15-20.
Ke G L, Zhang L G. Study on the relationship of restoration and maintenance of alloplasmic male sterile in Chinese cabbage [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalls Sinica, 1993, 2(1): 15-20. (in Chinese)
- [31] 张 艳, 王小佳, 李成琼, 等. 甘蓝细胞质雄性不育材料分子鉴定及花器官形态对核背景的响应 [J]. 园艺学报, 2010, 37(6): 915-922.
Zhang Y, Wang X J, Li C Q, et al. Molecular identification of *Brassica oleracea* CMS and the morphology response of flower to nuclear background [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(6): 915-922. (in Chinese)
- [32] 胡 滨, 陈观平, 施农农, 等. 植物细胞质雄性不育及其在育种中的应用 [J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(6): 689-693.
Hu B, Chen G P, Shi N N, et al. Plant cytoplasmic male sterility and its application on breeding [J]. Journal of Zhejiang Forestry College, 2006, 23(6): 689-693. (in Chinese)