

# 一种紫色大白菜细胞质不育系的分子鉴定

张德双, 陈 斌, 张凤兰, 余阳俊, 赵岫云, 于拴仓, 徐家炳

(北京蔬菜研究中心, 北京 100097)

**摘要:** 为了获得紫色大白菜细胞质不育系的特异序列, 鉴定该不育系所属的不育类型, 应用设计的 *of138* 上、下游引物 PCR 扩增 6 份材料: 紫色大白菜 CMS 不育系, 保持系 07-721, 杂交  $F_1$ , 3 个回交  $BC_1$  单株  $BC_{T1}$ 、 $BC_{T2}$  和  $BC_{T3}$ 。对获得的差异片段进行克隆、测序, 同源性比较。结果表明, 在紫色大白菜 CMS 不育系、杂交  $F_1$ 、3 个回交  $BC_1$  单株上均扩增到 309 bp 的特异产物, 而保持系 07-721 没有扩增产物。测序和同源性比对结果表明, 紫色大白菜 CMS 的 *of138* 与萝卜 *Ogura* 不育系的 *of138*、芸薹属作物与萝卜 *Ogu* CMS 体细胞杂种的 *of138* 同源性均达到 99%,  $E$  值为  $2e-155$ 。证明了紫色大白菜 CMS 不育系为一种改良的 *Ogura* 萝卜细胞质不育系, 同时初步探讨了该不育系和紫色基因的应用前景。

**关键词:** 紫色大白菜; *Ogu* CMS; *of138*; 应用

中图分类号: S634.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)03-0174-05

## Molecular Identification of A Purple Chinese Cabbage CMS Material

ZHANG De-shuang, CHEN Bin, ZHANG Feng-lan, YU Yang-jun,

ZHAO Xi-~~yun~~, YU Shuan-~~cang~~, XU Jia-~~bing~~

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100097)

**Abstract:** In order to identify and certify the genotype of a purple Chinese cabbage CMS, and use the purple characteristics in Chinese cabbage, *of138* primers were used for PCR analysis in 6 materials including purple Chinese cabbage CMS, maintainer line 07-721,  $F_1$ , 3 back-crossing segregating plants  $BC_{T1}$ ,  $BC_{T2}$ ,  $BC_{T3}$ . Then the PCR products were cloned, sequenced and aligned. Results showed 309 bp fragments could only be amplified in purple Chinese cabbage CMS,  $F_1$ ,  $BC_{T1}$ ,  $BC_{T2}$ ,  $BC_{T3}$ , excluding maintainer line 07-721. Alignment results showed *of138* in purple Chinese cabbage CMS was homologous to *Ogu* CMS in *Raphanus sativus* and hybrids of *Brassica* crops with *Raphanus sativus*. The identities among them were 99%.  $E$  value was  $2e-155$ . Therefore, the purple Chinese cabbage CMS material belongs to an improved *Ogu* CMS genotype. The application of the CMS genotype and purple genes in the future is discussed.

**Key words:** Purple Chinese cabbage; *Ogu* CMS; *of138*; Application

随着人民生活水平的提高, 消费者对大白菜品质提出了更高的需求。大白菜品质主要包括商品品质、风味品质和营养品质。商品品质指外观形态、色泽等; 风味品质包括生食脆嫩、熟食易煮烂等; 营养品质主要指蛋白质、维生素等营养成分的含量。

大白菜球色育种(黄心、桔红心和紫色等品种的选育)是品质育种的重要研究内容之一。紫色大白菜品种的选育是继桔红心和黄心大白菜品种育成之后的又一新的育种目标。紫色大白菜品种不仅丰富了大白菜种质资源、增添了品种的多样性, 而且也进一步满足了人们对大白菜品质以及特殊商品性的要

求。韩国首先推出了应用细胞质 CMS 不育系育成的紫色小白菜杂交  $F_1$  (中文名称为“紫罗兰”), 在国内市场广泛流行, 影响较大。这份紫色小白菜表现为个体生长速度较慢, 叶片正面紫色, 叶背面绿色, 阳光充足时紫色表现更为突出等特点。采用多份大白菜、小白菜品种与引进的紫色小白菜杂交, 杂交后代的不育度、不育株率均为 100%, 但初花期有死蕾现象<sup>[1]</sup>。张德双等<sup>[1]</sup>采用大白菜与紫色小白菜变种间杂交, 获得了紫色的  $F_1$ , 用大白菜与之多代回交转育, 得到了 2 份紫色的大白菜中间材料。但研究发现, 从回交  $BC_1$  开始, 随着回交转育代数的增加,

收稿日期: 2009-03-25

基金项目: 国家自然科学基金(30871710); 北京市自然科学基金(6092009); 北京市农林科学院青年基金

作者简介: 张德双(1969-), 男, 黑龙江穆稊人, 副研究员, 博士, 主要从事大白菜育种和分子生物学研究工作。

紫色性状发生了不同程度的分离<sup>[2]</sup>。

由于在大白菜资源中没有发现自身存在的细胞质不育源, 目前生产中应用的细胞质不育系均来源于异源细胞质, 主要有三种: 萝卜 Ogu CMS、甘蓝型油菜 Pol CMS 和甘蓝型油菜 CMS96<sup>[3,4]</sup>。众所周知, 利用雄性不育系生产大白菜一代杂交种不仅亲本繁殖容易, 杂种一代纯度高, 而且有利于新品种的自我保护。细胞质雄性不育是生产大白菜一代杂种的理想系统, 已成为国内外竞争的热点。韩国等国家推出的紫色小白菜 CMS 新品种已经充分表现出应用细胞质雄性不育系育种的优势, 即商品种杂交率高, 品种具有自我保护等。

为了鉴定紫色小白菜细胞质雄性不育系的类型, 以寻找恢复系恢复其育性, 并获得紫色核基因, 本研究利用基于同源序列基因扩增(Homology-based candidate gene)方法<sup>[5,6]</sup>, 依据与细胞质不育有关的线粒体嵌合基因 *orf138* 设计引物, 对不育系和保持系的线粒体 DNA 进行 PCR 扩增, 获得差异片段, 并测序, 对序列进行同源性比较, 分析序列的生物学信息, 鉴定该不育系的类型, 为该细胞质 CMS 不育系的应用和开展紫色大白菜育种奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

以紫色小白菜为母本与普通大白菜杂交, 获得紫色的杂交 F<sub>1</sub>, 再以紫色的 F<sub>1</sub> 为母本与普通大白菜杂交, 获得紫色大白菜 BC<sub>1</sub> 回交一代分离群体。试验所用的紫色大白菜 CMS 不育系, 保持系 07-721, 杂交 F<sub>1</sub>, 3 个回交 BC<sub>1</sub> 单株的种子均来源于北京蔬菜研究中心大白菜课题。

### 1.2 试验方法

1.2.1 线粒体 DNA 的提取 参考张德双<sup>[3]</sup>的试验步骤, 利用 CTAB 法提取紫色大白菜 CMS、大白菜保持系 07-721、F<sub>1</sub>, 3 个 BC<sub>1</sub> 回交一代 BC<sub>F-1</sub>、BC<sub>F-2</sub>、BC<sub>F-3</sub> 的总 DNA。

1.2.2 引物的设计 根据 *orf138* 序列的保守区, 并参考已设计的引物<sup>[5]</sup>, 在上海生物工程公司合成 *orf138* 上、下游引物, 引物序列见表 1。

表 1 *orf138* 引物的设计

Tab. 1 <i>orf138</i> primers used for PCR analysis	
基因 Gene	引物 Primer
<i>orf138</i>	5'-CCA TAT TTG GCT AAG CTG GTT TTC T-3'
	5'-TAT CAT CTC GGT CCA TTG TCC AG-3'

1.2.3 PCR 反应体系和程序 PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 其中包括: ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L, 10 $\times$  Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 2

$\mu$ L, dNTPs 2  $\mu$ L (2.0 mmol/L), 引物各 2  $\mu$ L (2.0  $\mu$ mol/L), 模板 DNA 1  $\mu$ L, rTaq 酶(5 U/ $\mu$ L, Takara) 0.5  $\mu$ L。加一滴矿物油、涡旋后, 瞬间离心。

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 59 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测。

PCR 扩增所需的 rTaq 酶和 dNTPs 均购于 Takara 公司。PCR 仪为 Life Express。

1.2.4 差异片段的回收、克隆和测序 用 Takara 公司的 Agrose Gel DNA Extraction Kit 试剂盒凝胶回收 PCR 产物, 再与 pGEM-T easy 载体连接, 然后转化 TOP10 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 提取质粒, *EcoR* I 酶切电泳鉴定为阳性克隆后, 交由上海生物工程公司测序。

1.2.5 序列分析 将测序得到的核苷酸序列和推导的氨基酸序列分别在 NCBI 数据库( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中应用 Blast 程序进行同源性检索。

试验于 2009 年在北京蔬菜研究中心完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 的电泳检测

DNA 电泳检测结果如图 1。结果表明, 提取的 DNA 质量较高, 没有拖尾或弥散现象, 可以进行后续的研究。

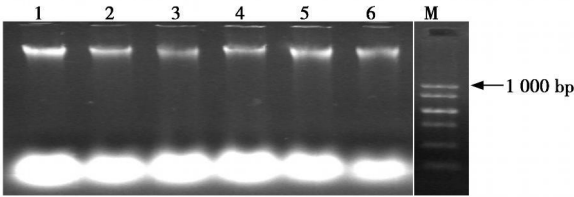
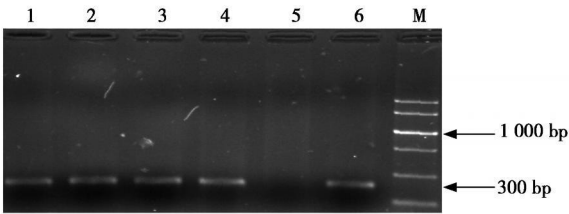


图 1 DNA 的电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of DNA isolated by CTAB method



1. BC<sub>F-1</sub>; 2. BC<sub>F-2</sub>; 3. BC<sub>F-3</sub>; 4. F<sub>1</sub>;  
5. 保持系 07-721; 6. 紫色大白菜 CMS; M. Marker.  
1. BC<sub>F-1</sub>; 2. BC<sub>F-2</sub>; 3. BC<sub>F-3</sub>; 4. F<sub>1</sub>; 5. Maintainer 07-721;  
6. Purple Chinese cabbage CMS; M. Marker.

图 2 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR products of CMS and maintainer by *orf138* primer combination

### 2.2 特异序列的获得

对 *orf138* 上、下游引物 PCR 扩增的产物进行电

泳,结果如图 2。由图 2 可见,在紫色大白菜 CMS, F<sub>1</sub>, BC<sub>+</sub>1, BC<sub>+</sub>2, BC<sub>+</sub>3 中均可扩增出 300 bp 的特异带,而保持系 07-721 没有扩增产物。这是由细胞质不育系母性遗传的特点所决定,即所有与细胞质不育系杂交、回交的后代均为细胞质不育,因此, F<sub>1</sub>, BC<sub>+</sub>1, BC<sub>+</sub>2, BC<sub>+</sub>3 具有和紫色大白菜 CMS 相同的不育基因结构,均可以扩增出 300 bp 的产物,而保持系 07-721 由于不具有与紫色大白菜 CMS 不育系

相同的不育基因结构,所以没有 300 bp 的扩增产物。电泳结果初步说明,韩国的紫色白菜 CMS 不育系属于一种 Ogu CMS 不育类型。

### 2.3 序列的测定

PCR 产物经凝胶回收,与载体连接,转化感受态细胞,酶切鉴定为阳性克隆后,送交测序。测序结果表明,该序列的长度为 309 bp。紫色大白菜 CMS 不育系的序列如图 3。

```
CCATATTTGGCTAAGCTGGTTTTCTAACAACCAACATTGTTTACGAACCATGAGACA
TCTAGAGAAGTTAAAAATTCCATATGAATTTAGTATGGGTGGCTAGGTGTCAAAA
TTACAATAAAATCAAATGTACCTAACGATGAAGTGACGAAAAAAGTCTCACCTATC
ATTAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGGGAAAGGGGAAATA
GAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGA
AAAAAAGAGGTGGACAATGGACCGAGATGATA
```

图 3 紫色大白菜 CMS 不育系的序列

Fig. 3 Sequence linked to a purple Chinese cabbage CMS

紫白菜 <i>orf138</i>	CCATATTTGGCTAAGCTGGTTTTCTAACAACCAACATTGTTTACGAACCATGAGACATCT	60
萝卜 <i>orf138</i>	CCATATTTGGCTAAGCTGGTTTTCTAACAACCAACATTGTTTACGAACCATGAGACATCT	298
紫白菜 <i>orf138</i>	AGAGAAGTTAAAAATTCCATATGAATTTAGTATGGGTGGCTAGGTGTCAAAATTACAAT	120
萝卜 <i>orf138</i>	AGAGAAGTTAAAAATTCCATATGAATTTAGTATGGGTGGCTAGGTGTCAAAATTACAAT	358
紫白菜 <i>orf138</i>	AAAATCAAATGTACCTAACGATGAAGTGACGAAAAAAGTCTCACCTATCATTaaagggga	180
萝卜 <i>orf138</i>	AAAATCAAATGTACCTAACGATGAAGTGACGAAAAAAGTCTCACCTATCATTAAAGGGGA	418
紫白菜 <i>orf138</i>	aatagaggggaaagagggaaaaaaagaggggaaagggggaatagaggggaaagagggaaaa	240
萝卜 <i>orf138</i>	AATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAA	478
紫白菜 <i>orf138</i>	aaaagaggggaaaggggaaatagaggggaaagaggaaaaaaagaggTGGACAATGGACC	300
萝卜 <i>orf138</i>	AAAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGTGGAAAAATGGACC	538
紫白菜 <i>orf</i>	GAGA	304
萝卜 <i>orf138</i>	GAGA	542

图 4 紫色大白菜 CMS *orf138* 与萝卜 Ogu *orf138* 的比较

Fig. 4 Comparison of *orf138* in purple Chinese cabbage CMS with Ogu *orf138* in *R. sativus*

### 2.4 同源性比较

将测定的核苷酸序列在 NCBI 数据库中应用 Blast 程序进行同源性比对。结果表明,紫色大白菜 CMS *orf138* 的序列与萝卜 Ogu CMS 不育系的 *orf138*、芸薹属作物与萝卜 Ogu CMS 体细胞杂种的 *orf138* 同源性均达到 99% (303/304), E 值 (Expect) 为 2e-155。紫色大白菜 CMS *orf138* 与萝卜 Ogu *orf138* 序列的比较结果见图 4。

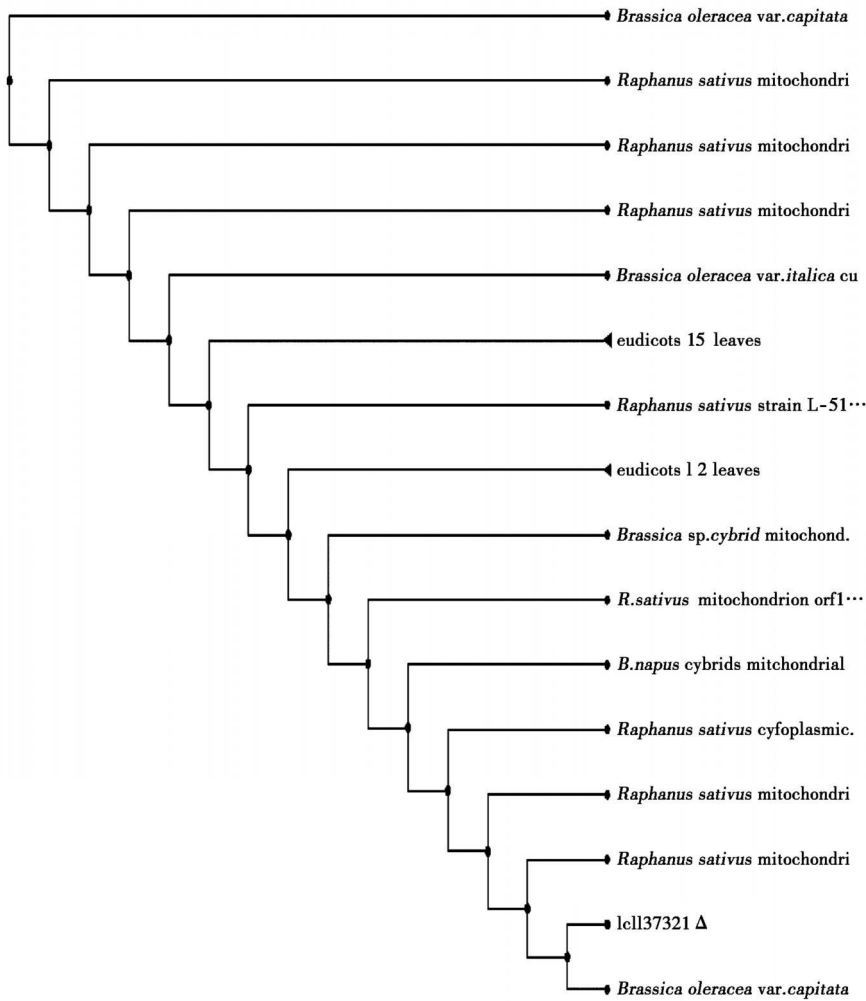
图 5 为应用 Blast 成组比对法获得的紫色大白菜 *orf138* 聚类图,由图 5 可见,紫色大白菜 CMS 不育系的 *orf138* 存在于 NCBI 数据库中已登录的 15 种十字花科 Ogu CMS 不育系中,且为一段核心的保守序列。

表 2 为 NCBI 数据库中,紫色大白菜 CMS *orf138* 与十字花科芸薹属、萝卜属 Ogu CMS 不育系的比较结果。由表 2 可见,它与 NCBI 数据库中已登录的十

字花科芸薹属、萝卜属 Ogu CMS 14 份材料的同源性均达到 99%, E 值为 2e-155,也进一步证明了紫色大白菜 CMS 不育系是一种改良的 Ogura 萝卜细胞质不育系。

## 3 讨论

本研究所用的紫色小白菜试验材料为一份细胞质雄性不育材料,它与普通大白菜杂交的 F<sub>1</sub> 全部表现为紫色,在回交 BC<sub>1</sub> 群体中,紫色性状出现了明显的分离。这是由于紫色基因存在于小白菜的核基因组中,随着与大白菜回交转育代数的增加,小白菜的核基因组逐渐被大白菜的核基因组所替换,导致小白菜的紫色基因在大白菜中逐渐消失,出现了紫色性状的明显分离。因此,如果没有恢复系恢复育性,小白菜的紫色性状很难在大白菜育种中应用。



三角代表紫色大白菜 *orf138*。  
Triangle indicates *orf138* in purple Chinese cabbage CMS.

图 5 应用 Blast 成组比对法获得的紫色大白菜 *orf138* 聚类图

Fig. 5 Homology-tree produced by Blast pairwise alignments

表 2 紫色大白菜 CMS *orf138* 与芸薹属、萝卜属 *Ogu* CMS 不育系的比较

Tab. 2 Comparison of *orf138* in purple Chinese cabbage CMS with *Ogu orf138* in *Brassica* and *Raphanus*

登录号 Accession	描述 Description	E 值 E value	同源性/ % Max identity
EU604644.1	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> cultivar NAU-Y04A tRNA-Met (trnM) gene, complete sequence; and ogura cytoplasmic male sterility-related protein gene, complete cds; mitochondrial	2e-155	99
EU604643.1	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> cultivar NAU-Lb03A tRNA-Met (trnM) gene, complete sequence; and ogura cytoplasmic male sterility-related protein gene, complete cds; mitochondrial	2e-155	99
AY567471.1	<i>Raphanus sativus</i> strain L-51-chun A-4 cytoplasmic male sterile-associated protein gene, complete cds; mitochondrial	2e-155	99
Z12626.1	<i>Brassica</i> sp. cybrid mitochondrial DNA for ORF158, ORF138 and tRNA-Met	2e-155	99
Z18896.1	<i>R. sativus</i> mitochondrion orf138, orfB and trnM genes	2e-155	99
Z12627.1	<i>B. napus</i> cybrids mitochondrial atpA gene encoding ATPA	2e-155	99
DQ010330.1	<i>Raphanus sativus</i> cytoplasmic male sterile-associated protein gene, complete cds; mitochondrial	2e-155	99
AB055442.1	<i>Raphanus sativus</i> mitochondrial gene for ORF138, haplotype: H, complete cds	2e-155	99
AB055441.1	<i>Raphanus sativus</i> mitochondrial gene for ORF138, haplotype: G, complete cds	2e-155	99
AB055439.1	<i>Raphanus sativus</i> mitochondrial gene for ORF138, haplotype: E, complete cds	2e-155	99
AB055438.1	<i>Raphanus sativus</i> mitochondrial gene for ORF138, haplotype: D, complete cds	2e-155	99
AB055437.1	<i>Raphanus sativus</i> mitochondrial gene for ORF138, haplotype: C, complete cds	2e-155	99
AB055436.1	<i>Raphanus sativus</i> mitochondrial gene for ORF138, haplotype: B, complete cds	2e-155	99
AB055435.1	<i>Raphanus sativus</i> mitochondrial gene for ORF138, haplotype: A, complete cds	2e-155	99

本研究通过设计 *of138* 上、下游引物 PCR 扩增紫色大白菜 CMS 不育系, 保持系 07-721, 杂交 F<sub>1</sub>, 3 个回交 BC<sub>1</sub> 单株 BC<sub>1F1</sub>、BC<sub>1F2</sub> 和 BC<sub>1F3</sub> 共 6 份材料的 DNA。电泳结果表明, 在 4 个不育系中扩增到 309 bp 的 *of138* 序列, 同源性比对结果表明, 该序列与萝卜 Ogu CMS 及芸薹属作物与萝卜 Ogu CMS 的体细胞杂种的 *of138* 同源性达 99% (303/304), E 值为 1e-105。充分证明了引进的韩国紫色小白菜细胞质 CMS 不育系为一种改良的 Ogura 萝卜细胞质不育系。因此, 育种者可以在甘蓝型油菜中寻找恢复 Ogura 不育系的恢复基因, 从而获得紫色的核基因, 并尽快在紫色大白菜品种选育中应用。

国外学者很早就开展了萝卜 Ogu CMS、甘蓝型油菜 Ogu CMS 和芸薹属体细胞杂种 Ogu CMS 的 *of138* 研究工作<sup>[7-11]</sup>。国内学者也开展了相关研究, 王春国<sup>[5]</sup>对系和保持系分别进行了有关研究, 获得了与 CMS 不育系相关的特异带。张德双<sup>[3]</sup>对由美国引进的 Ogura 不育系进行了研究, 获得了 *of138* 的序列。Shi G J 等<sup>[12]</sup>应用 RAPD 技术对小白菜 Ogura 不育系进行了研究, 获得了与 CMS 不育系相关的序列。

萝卜 Ogu CMS 是日本学者小仓 1968 年在日本鹿儿岛一个萝卜品种育种田中发现的雄性不育源, 也是十字花科作物最早发现的不育源, 后来相继被引入到其他十字花科作物中。研究证明, 最早由美国引进的 Ogura 不育系存在多代回交退化等问题<sup>[3,4]</sup>, 在大白菜育种中难以利用。后来经过多位学者的改造, 出现了许多改良的 Ogura 不育系, 目前在甘蓝型油菜、甘蓝和青花菜等蔬菜作物中成功应用。张德双等<sup>[1]</sup>研究认为, 无论紫色小白菜本身, 还是经由紫色小白菜转入到大白菜的 Ogura 不育系依然存在部分退化问题, 表现为植株生长势弱, 与大白菜杂交一代的种子偏小等问题, 这是育种者今后应用紫色小白菜 CMS 不育系育种时应该注意的问题。

有关大白菜紫色性状的 QTL 定位和连锁标记等相关研究正在进行中。

## 参考文献:

- [1] 张德双, 张凤兰, 余阳俊, 等. 紫色大白菜育种材料的创造[J]. 长江蔬菜, 2007(11): 52-53.
- [2] 张德双, 张凤兰, 余阳俊, 等. 紫色大白菜育种思路初探[J]. 长江蔬菜, 2008(11b): 14-17.
- [3] 张德双. 大白菜 CMS96 细胞质雄性不育的分子特性及育种应用研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2006.
- [4] 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.
- [5] 王春国, 宋文芹. 花椰菜细胞质雄性不育基因特异 PCR 标记的筛选[J]. 遗传, 2005(2): 236-240.
- [6] 张德双, 张凤兰, 王永健, 等. 大白菜细胞质雄性不育的分子鉴定及序列分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 53-59.
- [7] Grolen M, Burdar F, Bonhomme S, et al. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated *of138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* hybrids[J]. Mol Gen Genet, 1994, 243: 540-547.
- [8] Bonhomme S, Budar F, Lancelin D, et al. Sequence and transcript analysis of the Nco 2. 5 Ogura specific fragment correlated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica* hybrids[J]. Mol Gen Genet, 1992, 235: 340-348.
- [9] Brown G G, Doma M, Dupauw M. Molecular analysis of *Brassica* CMS and its application to hybrid seed production[J]. Acta Horticulture, 1998, 459: 265-274.
- [10] Iwabuchi M, Koizuka N, Fujimoto H. Identification and expression of the kosena radish (*Raphanua sativus* cv. *kosena*) homologue of the Ogura radish CMS-associated gene, *of138*[J]. Plant Mol Biol, 1999, 39(1): 183-188.
- [11] Yann Duroc, Catherine Gaillard, Sophie Hiard, et al. Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for Ogura cytoplasmic male sterility in *Brassicaceae* [J]. Biochimie, 2005, 87: 1089-1100.
- [12] Shi G J, Hou X L. RAPD analysis for mtDNA of Ogu CMS and its maintainer in non-heading Chinese cabbage[J]. Acta Horticulturae, 2007, 11: 295-301.