

# 大白菜线粒体 DNA 提取及细胞质雄性不育系 RAPD 分析

张德双<sup>1</sup>, 王国臣<sup>2</sup>, 张凤兰<sup>1</sup>, 王永健<sup>1</sup>, 方智远<sup>3</sup>, 余阳俊<sup>1</sup>, 赵岫云<sup>1</sup>, 徐家炳<sup>1</sup>

(1. 北京蔬菜研究中心, 北京 100097; 2. 首都师范大学, 北京 100037; 3. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 提取高质量线粒体 DNA(mtDNA) 是研究大白菜细胞质雄性不育系不育分子特性的前提。以大白菜绿色叶片为试验材料, 应用一种省时、简便、操作步骤少的方法, 快速获得 3 组 11 份大白菜的 mtDNA(包括保持系、Ogu CMS、Pol CMS 和 CMS96 细胞质雄性不育系)。试验中不需要加入 *DNase I* 酶消化核 DNA, 提取的 mtDNA 质量较好; 同时, 采用 RAPD 技术, 对 11 份大白菜 mtDNA 进行多态性分析, 获得了与大白菜 Ogu CMS 和 CMS96 不育系相关的差异片段 10 条, 与大白菜 Ogu CMS 不育系相关的差异片段 3 条。初步证实: 大白菜 CMS96 和大白菜 Ogu CMS 不育系既有相似性又存在差异性。

**关键词:** 大白菜; 细胞质雄性不育; mtDNA; 提取; RAPD

中图分类号: S634.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0124-06

## Isolation of Mitochondrial DNA and RAPD Analysis with Three Cytoplasmic Male Sterilities in Chinese Cabbage

ZHANG De-shuang<sup>1</sup>, WANG Guo-chen<sup>2</sup>, ZHANG Feng-lan<sup>1</sup>, WANG Yong-jian<sup>1</sup>,  
FANG Zhi-yuan<sup>3</sup>, YU Yang-jun<sup>1</sup>, ZHAO Xi-tun<sup>1</sup>, XU Jia-bing<sup>1</sup>

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 10097, China;

2. Capital Normal University, Beijing 100037, China;

3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Isolation mitochondrial DNA(mtDNA) is the first step for studying molecular characteristics in cytoplasmic male sterile Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). A simple and economical method was introduced in this article. Green leaves were used without adding *DNase I* enzyme to eliminate nuclear DNA in it. 11 mtDNAs in Chinese cabbage(including maintainers and 3 cytoplasmic male sterilities: Ogu CMS, Pol CMS and CMS96) were isolated by it. Meanwhile, through RAPD technique, 10 special fragments linked to Ogu CMS and CMS96 were found. 3 special fragments linked to Ogu CMS were found. It primarily proved that the male molecular characteristics of Ogu CMS and CMS96 in Chinese cabbage had similarities as well as differences

**Key words:** Chinese cabbage; Cytoplasmic male sterility; mtDNA; Isolation method; RAPD

大白菜起源于中国, 目前推广的优良品种绝大部分为杂种一代。大白菜杂种一代主要采用自交不亲和系和雄性不育系繁殖, 但自交不亲和系繁殖成本较高, 亲本生活力容易下降, 制种时很难达到 100% 的杂交率; 而细胞质雄性不育是生产大白菜一代杂种的理想系统, 亲本繁殖容易, 杂种一代纯度

高。

在大白菜育种中, 研究最多、利用最广泛的是 Ogu CMS(萝卜胞质不育)、Pol CMS(波里马胞质不育)和大白菜 CMS96(新型甘蓝型油菜胞质不育)3 种不育系。大白菜 CMS96 不育系与 Ogu CMS、Pol CMS 不育系相比, 优点尤为突出<sup>[1]</sup>。为此, 有必要

收稿日期: 2006-09-05

基金项目: 北京市自然科学基金项目(6012008); 北京市委组织部优秀人才项目(200503)

作者简介: 张德双(1969-), 男, 黑龙江穆棱人, 博士, 主要从事大白菜育种和良种繁育工作。

从分子水平探讨大白菜 CMS96 不育系与 Ogu CMS、Pol CMS 不育系的异同。

有关细胞质不育的分子机理研究, 普遍认为, 细胞质不育基因主要分布在线粒体基因组中, 线粒体基因组与 CMS 直接相关。因此, 如何快速和简便地获得高质量的 mtDNA 就成为开展大白菜细胞质不育机制研究的关键。由于植物 mtDNA 含量较低, 常用的提取方法多以黄化苗为材料, 主要采用蔗糖密度梯度离心的方法, 不仅步骤繁琐, 工作量大, 而且需要消耗大量 *DNase* I 酶等试剂。本研究参照并优化了 Nunzia S 等<sup>[2]</sup>提取马铃薯 mtDNA 的方法, 主要采用高浓度 NaCl 和差数离心获得高质量的大白菜 mtDNA。同时, 采用 RAPD 技术对 11 种大白菜 mtD-

NA 进行多态分析, 获得与大白菜细胞质雄性不育系 Ogu CMS 和 CMS96 相关的差异片段。

1 材料和方法

1.1 材料

供试大白菜材料有 3 组 11 份, 每组内均有 3 种同核异质 Pol CMS, Ogu CMS, CMS96 不育系和同一保持系, 即每组材料中细胞核相同而具有 4 种不同来源的细胞质(第一组除外), 保持系对各不育系回交代数均为 6 代以上, 为近等基因系( near isogenic line, NIL)。供试材料代号见表 1, 所有材料来源于北京蔬菜研究中心大白菜课题。

表1 3组 11 份大白菜保持系和不育系的背景来源及主要特点

Tab.1 Background and characteristics of three sets of maintainers and CMS lines in Chinese cabbage

代号 Code	株系号 Number	不育类型 CMS types	雄性不育源 Origin	植株生长状况 Growth	对应保持系 Corresponding maintainer
Pol CMS 1	04- 745	Pol CMS	由 1992 年西北农林科技大学引入的大白菜 Pol CMS 杂 13、杂 33 转育而成	生长正常, 叶片不黄化	保持系 1, 04- 709 晚熟, 高桩, 叠抱
Ogu CMS 1	04- 748	Ogu CMS	由 1993 年美国引入的大白菜 Ogu CMS 95A12、95A13 转育而成	生长正常, 叶片不黄化	保持系 1, 04- 709 晚熟, 高桩, 叠抱
Pol CMS 2	05- 753	Pol CMS	由 1992 年西北农林科技大学引入的大白菜 Pol CMS 杂 13、杂 33 转育而成	生长正常, 叶片不黄化	保持系 2, 05- 752 晚熟, 中高桩, 叠抱
Ogu CMS 2	05- 754	Ogu CMS	由 1993 年美国引入的大白菜 Ogu CMS 95A12、95A13 转育而成	生长正常, 叶片不黄化	保持系 2, 05- 752 晚熟, 中高桩, 叠抱
CMS96 2	05- 755	CMS96	由 1996 年法国引入的新型甘蓝型油菜 CMS96 不育源转育而成	生长正常, 叶片不黄化	保持系 2, 05- 752 晚熟, 中高桩, 叠抱
Pol CMS 3	05- 760	Pol CMS	由 1992 年西北农林科技大学引入的大白菜 Pol CMS 杂 13、杂 33 转育而成	生长正常, 叶片不黄化	保持系 3, 05- 758 晚熟, 高桩, 叠抱
Ogu CMS 3	05- 761	Ogu CMS	由 1993 年美国引入的大白菜 Ogu CMS 95A12、95A13 转育而成	生长正常, 叶片不黄化	保持系 3, 05- 758 晚熟, 高桩, 叠抱
CMS96 3	05- 762	CMS96	由 1996 年法国引入的新型甘蓝型油菜 CMS96 不育源转育而成	生长正常, 叶片不黄化	保持系 3, 05- 758 晚熟, 高桩, 叠抱

1.2 线粒体 DNA 提取方法

参照并改良 Nunzia S 等<sup>[2]</sup>提取马铃薯 mtDNA 的方法提取大白菜 mtDNA。

需强调的是所有步骤必须在 4℃ 下完成。取 60 g 叶片, 加入 300 mL 预冷的 Buffer A( 50 mmol/ L Tris- HCl , pH 8. 0; 1. 3 mol/ L NaCl; 25 mmol/ L EDTA, pH 8. 0; 0. 2% BSA)。使用前加入 0. 05% 的半胱氨酸和 56 mmol/ L 的 β 巯基乙醇。匀浆后 4 层纱布过滤, 悬浮液 500× g 离心 10 min, 取上清液。上清液再 2 600× g 离心 10 min, 第 2 次 2 600× g 离心 15 min, 取上清液。然后, 上清液 14 500× g 离心 15 min, 取沉淀。沉淀用 20 mL 预冷的 Buffer A 轻轻悬浮。悬浮液 14 500× g 离心 15 min, 取沉淀。沉淀中加入 9 mL 裂解 Buffer( 25 mmol/ L Tris-HCl, pH 8. 0; 20 mmol/ L EDTA, pH 8. 0; 0. 5% SDS)。在上述溶液中

加入蛋白酶 K, 使其终浓度为 50 μg/ mL。37℃ 水浴 2 h, 同时轻摇。加入等体积预冷的 Tris 饱和酚/ 氯仿( 1: 1), 上下颠倒数次, 静置 10 min。然后, 11 000× g 离心 15 min。小心吸取上层溶液到 2 mL 离心管中。加入 0. 1 倍体积 3 mol/ L 乙酸钠和 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, - 20℃ 过夜。18 000× g 离心 20 min, 在超净台上吹干 mtDNA。加入适量 ddH<sub>2</sub>O 或 TE 溶液溶解 mtDNA。用紫外分光光度计( Shimadzu UV- 1201, 日本) 以 OD<sub>260</sub>和 OD<sub>280</sub>值测定 DNA 浓度。用 0. 8% 琼脂糖凝胶电泳检测 mtDNA 质量。

1.3 基因组 DNA 的提取方法

参照 Murry H G 等<sup>[3]</sup>的方法加以调整进行 DNA 提取。

将 1. 5 g 去掉叶柄的叶片在液氮中研磨成粉末, 加入 9 mL 2% CTAB 提取液( 2% CTAB;

1.4 mmol/L NaCl; 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol/L EDTA, pH 8.0; 1% PVP-40; 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇), 混匀 65℃水浴 1 h。从水浴中取出离心管, 加 1/3 体积 5 mol/L 醋酸钾, 混匀冰浴 20 min。加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)抽提 2 次。小心吸取上清液, 加入 2/3 体积异丙醇沉淀 DNA。洗涤缓冲液(76%乙醇, 10 mmol/L 乙酸铵)洗涤一次, 吹干。加 TE 缓冲液溶解。加入 RNase A 使其终浓度达 100  $\mu$ g/mL, 混匀 37℃水浴 1 h。用等体积氯仿/异戊醇(24:1)抽提。取上清液, 加入 1/2 体积 7.5 mol/L 醋酸铵和 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA。70% 乙醇洗涤沉淀, 吹干, 加适量 ddH<sub>2</sub>O 溶解 DNA。

#### 1.4 RAPD 分析

rTaq 酶和 dNTPs 均购于 Takara 公司, 随机引物由上海生物工程公司合成。随机引物代号同 Operon 公司通用引物代号。

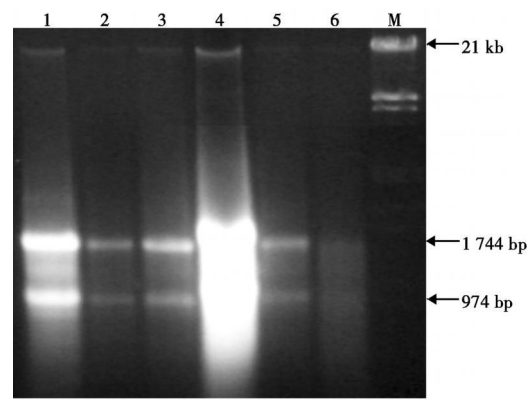
RAPD 反应体系为 12.5  $\mu$ L, 其中包括: ddH<sub>2</sub>O 8.05  $\mu$ L, 10 $\times$  buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 1.25  $\mu$ L, dNTPs 1  $\mu$ L (2.5  $\mu$ mol), 引物 1  $\mu$ L (15 ng/ $\mu$ L), 模板 DNA 1  $\mu$ L, rTaq 酶(5 U/ $\mu$ L, Takara) 0.2  $\mu$ L。加 1 滴矿物油, 涡旋后, 瞬间离心。

PCR 反应程序为: 94℃预变性 5 min; 然后 94℃变性 1 min, 37℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃延伸 5 min; 4℃保存。PCR 仪为 Life express。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 mtDNA 的凝胶电泳检测

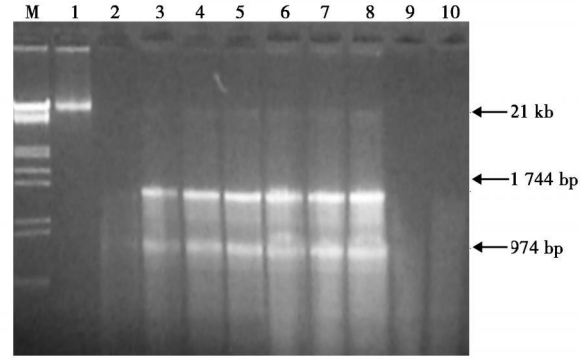
采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所获得的大白菜保持系和不育系 mtDNA, 结果见图 1。由图 1 可见, 所获得的大白菜 mtDNA 浓度和纯度较高。如果 mtDNA 原液稀释倍数合适, 凝胶电泳检测的结果显示 3 条主要带型, 分子量大小为 21 kb, 1 744 bp 和 974 bp。经紫外分光光度计(Shimadzu UV-1201, 日本)检测, 提取的大白菜保持系和不育系 mtDNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值为 2.09。可见, 所提取的大白菜 mtDNA 质量较好, 无降解。采用 EcoR I 和 MseI 双酶切大白菜 mtDNA, 25  $\mu$ L 酶切反应体系为: mtDNA 0.6  $\mu$ L, 5 $\times$  reaction buffer 5.0  $\mu$ L, EcoRI/MseI 2  $\mu$ L, 去离子水 17.4  $\mu$ L。酶切产物用 1.5% 的琼脂糖电泳检测, 结果见图 2。由图 2 可见, 大白菜 mtDNA 可以被充分酶切, 酶切产物主要集中在 1 700 bp 以下。同时, 由图 2 可见大白菜 nDNA(泳道)和 mtDNA(3~8 泳道)凝胶电泳结果的比较。



1~ 3. CMS96 不育系 mtDNA; 4~ 6. 保持系 mtDNA;  
M. Marker( $\lambda$  DNA EcoRI+ Hind III)  
1~ 3. CMS96 mtDNA; 4~ 6. Maintainer mtDNA; M. Marker  
( $\lambda$  DNA EcoRI+ Hind III)

图 1 大白菜 mtDNA 的凝胶检测

Fig. 1 Electrofile of mtDNAs



1. nDNA; 2. 保持系; 3. Pol CMS; 4. Ogu CMS; 5. CMS96; 6. 保持系;  
7. Pol CMS; 8. Ogu CMS; 9~ 10. Ogu CMS mtDNA 双酶切;  
M. Marker( $\lambda$  DNA EcoRI+ Hind III)  
1. nDNA; 2. Maintainer; 3. Pol CMS; 4. Ogu CMS; 5. CMS96;  
6. Maintainer; 7. Pol CMS; 8. Ogu CMS; 9~ 10. Ogu CMS mtDNA digested  
by EcoRI and Mse I; M. Marker( $\lambda$  DNA EcoRI+ Hind III)

图 2 大白菜 mtDNA 和双酶切产物在 1.5% 琼脂糖电泳检测

Fig 2 Electrofile of mtDNA and mtDNA digested by  
EcoR I and Mse I

为了研究和细化大白菜 mtDNA 电泳检测的带型数量, 对提取的大白菜 mtDNA 分 0.3~4.3  $\mu$ L 共 14 个点样量(每个泳道相差 0.3  $\mu$ L), 分别用浓度为 0.8%, 1.0%, 1.2% 和 1.5% 的琼脂糖进行凝胶电泳, 结果如图 3。表明大白菜 mtDNA 在不同浓度琼脂糖凝胶上主要表现为 21 kb, 1 744 bp 和 974 bp 3 种带型, 而后 2 条带较亮, 亮度是其他带型的 5 倍以上; 另外也可以看到 3~4 种大小不同的带型(图 3-C)。大白菜 mtDNA 在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳显示的带型多, 而在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示的带型更为清楚(图 3-D)。

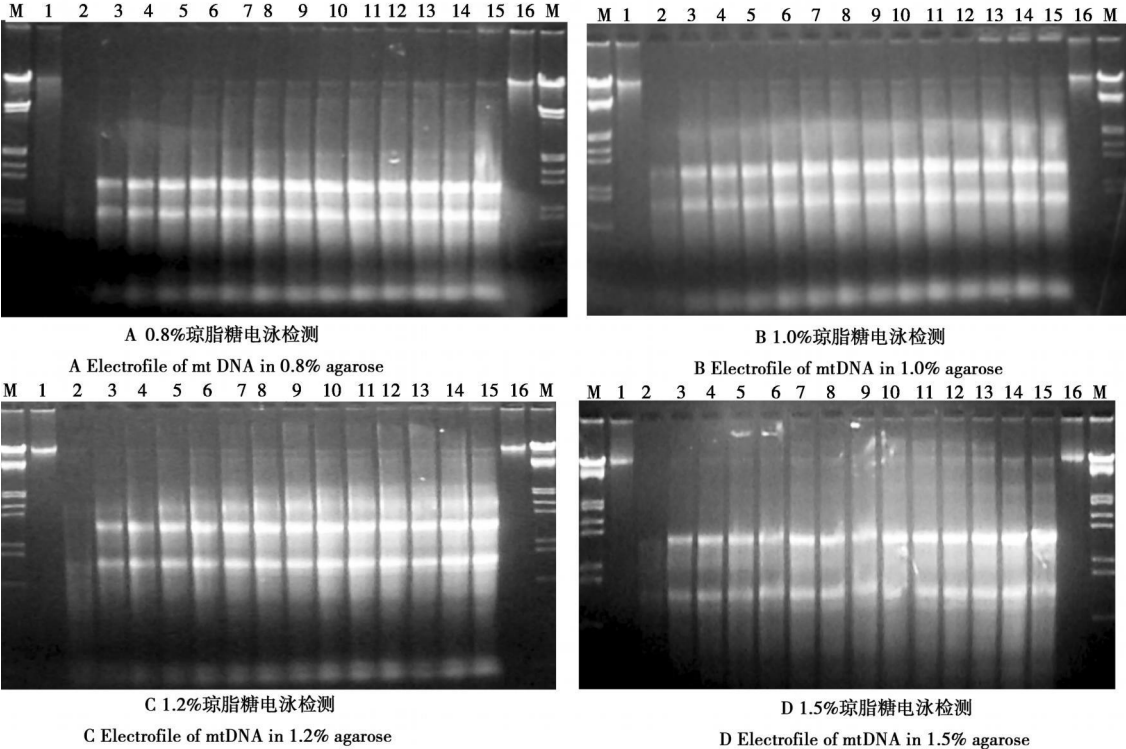
### 2.2 3 种大白菜不育系和保持系 RAPD 分析

选用 153 个 RAPD 随机引物对 3 组 11 份大白菜材料 mtDNA 和 1 份 nDNA 进行 PCR 扩增, 获得了

mtDNA 扩增的多态性结果。其中 4 个引物( OPU04, OPO04, OPAH16 和 OPB20) 均可以在全部 Ogu CMS 和 CMS96 中扩增出特异产物, 且大小相同, 占筛选引物的 2.6%; OPB06 引物仅在所有大白菜 Ogu CMS 不育系中扩增出特异产物, 且大小相同, 占筛选引物的 0.7%。在筛选的 153 个引物中, 没有获得与 PoI CMS 相关的特异产物。具体结果为: OPU04 引物在 3 种 Ogu CMS 和 2 种 CMS96 细胞质不育系中均可扩增出片段大小为 800 bp 的特征带( 图 4 A); OPB06 引物仅获得了与大白菜 3 种 Ogu CMS 不育相关的 1

700 bp 特征带( 图 4 B); OPB20 引物获得了与大白菜 3 种 Ogu CMS 和 2 种 CMS96 不育相关的 1 200 bp 的特异带( 图 4 C)。

表 2 列出了 153 个 RAPD 随机引物在全部 11 份大白菜 mtDNA 和 1 份 nDNA( 05- 752) 扩增产物统计结果。由表 2 可见, 153 个引物共扩增出 9 629 条谱带, 核基因扩增谱带数量最多, 达到 892 条谱带, 占扩增总带数的 9.3%。3 组材料内, 不同不育类型扩增的谱带数不同; 3 组材料间, 同一种不育类型扩增的谱带数也不同。



M. Marker(λDNA *Eco*R I+ *Hin*dIII); 1, 16. nDNA; 2~ 15. 0.3~ 4.3 μL mtDNA 点样量  
M. Marker(λDNA *Eco*R I+ *Hin*dIII); 1, 16. nDNA; 2~ 15. 0.3~ 4.3 μL mtDNA loading sample

图 3 大白菜 mtDNA 在 4 种浓度琼脂糖的电泳检测结果

Fig. 3 Electrophile of mtDNA in different agaroses

表 2 153 个 RAPD 随机引物对不育系、保持系 mtDNA 和保持系 nDNA 扩增谱带结果

Tab. 2 Results of RAPD analysis in nDNA, mtDNAs of CMS and maintainer by 153 primers

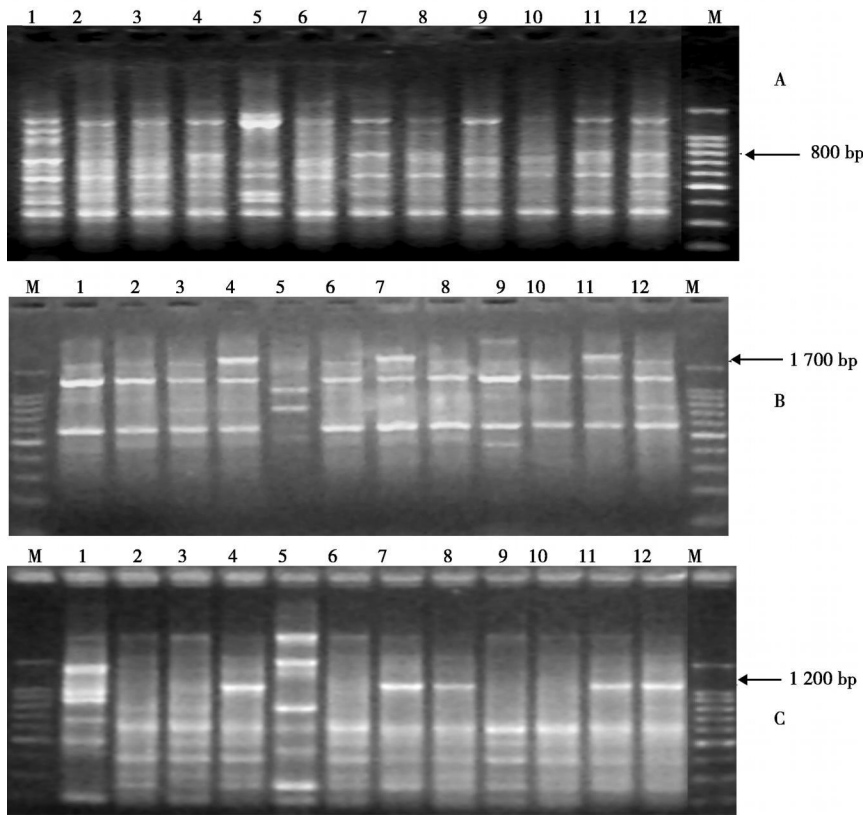
nDNA (05- 752)	保持系 1 Maintainer 1	Pol CMS 1	Ogu CMS 1	保持系 2 Maintainer 2	Pol CMS 2	Ogu CMS 2	CMS 96 2	保持系 3 Maintainer 3	Pol CMS 3	Ogu CMS 3	CMS 96 3	总和 Sum
892	837	792	807	802	849	794	799	654	794	791	818	9 629

3 讨论

植物线粒体基因组大小一般为 220~ 2 500 kb 不等, 不同种的线粒体基因组的存在形式也不相同。电镜观察表明, 大多数植物的 mtDNA 是由大小不同的环状和线状分子组成的复杂集合体, 由一个主基因组和通过重组衍生的一系列大小不等的分子组成, 如芸薹属 *Brassica campestris* 的 mtDNA 基因组 218

kb 主环通常被其含有的 2 kb 同向重复序列通过重组产生 83 kb 和 135 kb2 个小环组成。

以往主要参考 Kemble R J 等方法提取植物 mtDNA。本研究采用优化的 Nunzia S 等方法提取大白菜 mtDNA。其过程为: 先在高 NaCl 浓度下, 通过差数离心的方法, 分离、纯化线粒体, 然后破坏线粒体膜, 释放出大白菜 mtDNA, 进而提取和纯化 mtDNA。试验中不需要加入 *DNase* I 酶消化核 DNA, 通过不



A. OPF04 引物扩增产物电泳检测; B. OPB06 引物扩增产物电泳检测; C. OPB20 引物扩增产物电泳检测  
M. Marker( 100 bpDNA ladder); 1.核 DNA; 2,5,9. 保持系;3,6,10. Pol CMS;4,7,11. Ogu CMS;8,12. CMS96  
A. RAPD analysis of OPF04 primer; B. RAPD analysis of OPB06 primer; C. RAPD analysis of OPB20 primer  
M. Marker( 100 bp DNA ladder); 1. nDNA; 2,5,9. Maintainer; 3,6,10. Pol CMS; 4,7,11. Ogu CMS; 8,12. CMS96

图4 11份 mtDNA 和 1份 nDNA 的 RAPD 分析结果

Fig. 4 RAPD analysis of in 11 Chinese cabbage mtDNAs and nDNA

同转数离心的方法排除核 DNA 对 mtDNA 的污染;不用加入 *RNase* 酶来消除 RNA 的污染,虽然仍有少量 RNA 存在于 mtDNA 样品中,但不影响 mtDNA 酶切;同时,以绿色叶片为材料,不需要培育黄花苗,节省了时间,减少了种子用量。优化的 Nunzia scotti 等方法不仅简化了以往 mtDNA 提取的步骤,而且可以获得高质量的 mtDNA,并可应用于 RAPD 和 AFLP 等后续试验。

对大白菜 mtDNA 分别用浓度为 0.8% , 1.0% , 1.2% 和 1.5% 的琼脂糖进行凝胶电泳分离,结果表明,大白菜 mtDNA 电泳结果显示有 3 种主要带型: 21 kb, 1 744 bp 和 974 bp, 其中 1 744 bp 和 974 bp 带型较亮,亮度为其他带型的 5 倍以上,另外也可以看到分子量大小不同的其他 3~ 4 种带型。因为芸薹属的 mtDNA 由 83 kb 和 135 kb 两个小环组成,因此,大白菜 mtDNA 的电泳结果应该表现为 2 种以上的带型。史公军等<sup>[4]</sup>用改良的 Kemble R J 方法提取小白菜 mtDNA,电泳检测结果显示为 21 kb, 1 744 bp 和 974 bp 3 种带型;认为 1 744 bp 和 974 bp 是线粒体的质粒 DNA,同时发现,只有保持系具有 1 744 bp 和

974 bp 2 种质粒 DNA,不育系则没有。本研究中,应用改良的 Kemble R J 方法和优化的 Nunzia S 方法分别提取大白菜 mtDNA,大白菜 mtDNA 的电泳结果显示为保持系与不育系均具有 21 kb, 1 744 bp 和 974 bp 3 种带型,该结论与史公军等电泳检测小白菜 mtDNA 的结果存在差异,这可能是由于大、小白菜或者绿体、黄化苗的不同引起的。

RAPD 和 AFLP 等技术的出现可以在不知道基因组背景的前提下,为获得与细胞质 CMS 不育有关的特征序列或分子标记提供分子手段。目前,研究者已在芸薹属作物中鉴定和分离出与 CMS 有关的线粒体基因,并且都编码特异的蛋白质,如 Ogu 型萝卜的 *orf* 138<sup>[5]</sup>, Pol 型甘蓝型油菜的 *orf* 224<sup>[6]</sup>、Nap 型甘蓝型油菜的 *orf* 222<sup>[7]</sup> 以及叶用芥菜的 *orf* 220<sup>[8]</sup> 等。这些基因共同的特点是,一般由几个已知基因的部分序列经多次重组后与未鉴定的阅读框(unknown reading frame, URF)形成嵌合基因,位于正常线粒体基因的上游。王永飞等<sup>[9]</sup>用 RAPD 技术对大白菜 Pol CMS 不育系和保持系的总 DNA 进行分析,在不育系中获得了 CMSOPL01670 片段, Southern 杂交

证实获得了不育系特有片段, 其同源性均小于 30%。史公军等<sup>[4]</sup> 以小白菜 Ogu CMS 不育系为材料, 采用 RAPD 技术对不育系和保持系的 mtDNA 进行研究, 在保持系中获得了 OPAF12<sub>520</sub> 片段, 与发表序列相比, 其同源性小于 30%。本研究采用 RAPD 技术, 对 3 组 11 份大白菜保持系和同核异质不育系平行比较分析, 获得了与大白菜 Ogu CMS 和 CMS96 不育系相关的 800 bp 和 1 200 bp 特征片段、与大白菜 Ogu CMS 不育系相关的 1 700 bp 特征片段。但没有获得与大白菜 Pol CMS 相关的特征片段, 这可能是因为筛选的 153 个 RAPD 引物有限, 也可能是 Pol CMS 不育系具有不同的不育基因或序列的结果。

本试验初步证实了大白菜 CMS96 和大白菜 Ogu CMS 不育系既有相似性又存在差异性。目前, 已经获得了与大白菜 Ogu CMS 和 CMS96 不育系相关的序列, 同时也获得了大白菜 CMS96 和 Ogu CMS 不育系各自的不育嵌合基因, 初步揭示了二者不育基因结构的差异。今后的研究重点是构建具有转导肽 (targeting sequence) 序列的大白菜 CMS96 不育嵌合基因载体, 利用转基因手段获得在大白菜可育细胞质中表达的特异蛋白: 首先利用核基因来编码这些特异蛋白, 然后通过转导肽把这些蛋白从核中引导到细胞质线粒体功能部位发生生物学功能, 从而进一步验证所获得的大白菜 CMS96 不育基因的可能功能。

## 参考文献:

- [1] 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
- [2] Nunzia S, Teodoro C, Laurence M. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue[J]. Plant molecular biology reporter, 2001 international society for plant molecular biology( printed in Canada ), 2001, 19: 67a – 67h.
- [3] Murry H G, Thompspon W F. Rapid isolation of weight DNA [J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321.
- [4] 史公军, 王彦华, 侯喜林. 不结球白菜线粒体 DNA 的提取及分析[J]. 西北农业学报, 2004, 13(1): 52– 54.
- [5] 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* cybrids[J]. Mol Gen Genet, 1992, 235: 340– 348.
- [6] Brown G G, Doma M, DuPauw M, *et al.* Molecular analysis of *Brassica* CMS and its application to hybrid seed production [J]. Acta Hort, 1998, 459: 265– 274.
- [7] L' Homme Y, Brown G G. Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile *Brassica* mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(8): 1903– 1909.
- [8] 杨景华, 张明方, 喻景权, 等. 叶用芥菜细胞质雄性不育相关基因 *orf* 220 的分子特性[J]. 遗传学报, 2005, 32(6): 594– 599
- [9] 王永飞, 马三梅, 张鲁刚, 等. 大白菜细胞质雄性不育系 RAPD 特异扩增片段的克隆及其序列分析[J]. 西北植物学报, 2003, 23(1): 49– 53.