

doi:10.7668/hbxb.2014.06.008

甘蓝型油菜 Ogu CMS 恢复材料 1575R 的分子初步鉴定

许婷¹,董振生¹,张搏¹,高永祥²,段海峰¹,黄伟男¹,董军刚¹

(1.西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100;2.周至县种子技术推广服务站,陕西周至 710400)

摘要:对甘蓝型油菜萝卜质不育系(Ogu CMS)13个恢复材料(1575R)进行Ogu CMS恢复基因 *Rfo* 及其旁侧特异性标记分子水平鉴定,为鉴定有别于国外恢复系提供依据。用 *Rfo* 特异性分子标记、5个 *Rfo* 连锁的特异性分子标记、具有缩短的萝卜片段的芸薹属 *Ogura* 恢复系(SRF系)特异性标记对1575R的13个恢复材料进行检测,检测以甘蓝型油菜 Ogu CMS 的4个不育材料和4个保持材料为对照,检测结果与国外同类的恢复材料RRH1、R113、R2000、SRF系和NW1717做比较鉴定。1575R的13个恢复材料都含有Ogu CMS的恢复基因 *Rfo*,而缺少了RRH1、R113、R2000共有的标记BolJon。同时,1575R含有和NW1717相同的标记。由此初步鉴定出1575R可能和RRH1、R113、R2000、SRF系是不同的,而和NW1717的同源性最近。

关键词:Ogu CMS;恢复基因 *Rfo*;分子标记

中图分类号:Q78;S635.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)06-0040-05

Preliminary Molecular Identification of Ogu CMS Restorers 1575R in *Brassica napus*

XU Ting¹, DONG Zhen-sheng¹, ZHANG Bo¹, GAO Yong-xiang²,
DUAN Hai-feng¹, HUANG Wei-nan¹, DONG Jun-gang¹

(1. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Zhouzhi County Seed Technology Popularization Service Station, Zhouzhi 710400, China)

Abstract: The objective of this study is to make molecular identification of 13 Ogu CMS restorers(1575R) in *Brassica napus* with restorer gene *Rfo* and its specific markers to provide basis for different restorers from foreign restorers. *Rfo* specific marker, linkage markers and specific markers of SRF lines are used to test 1575R with the negative control of 4 maintainer lines and 4 sterile lines. Testing results are used to compare 1575R with foreign restorers RRH1, R113, R2000, SRF lines and NW1717. All the 13 restorers of 1575R lines contain the restorer gene *Rfo*. 1575R lines lack the marker BolJon which is all owned by RRH1, R113, R2000. 1575R contained the same specific markers with NW1717. 1575R may be different from RRH1, R113, R2000, SRF lines and have a close homology with NW1717.

Key words: Ogu CMS; Restorer gene *Rfo*; Molecular markers

Ogura^[1]在日本鹿儿岛的萝卜中发现了Ogura CMS,由细胞质中线粒体嵌合基因 *orf138* 和1对隐性细胞核基因(*rf1f*)共同控制^[2-4]。由于其对环境反应不敏感,不育性十分稳定,几乎所有的甘蓝型油菜品种都能作它的保持系,且容易转育成不同熟性、

不同品质的不育系,被认为是目前世界上不育性最稳定的油菜不育材料^[5]。1977年Bannerot等^[6]用连续回交的方法把甘蓝型油菜的细胞核导入萝卜Ogura CMS,育成甘蓝型油菜不育系。但由于油菜品种中不存在Ogura CMS系的恢复源,因此,选育甘

收稿日期:2014-09-07

基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划项目(2011KTZB02-01-03)

作者简介:许婷(1990-),女,陕西南郑人,在读硕士,主要从事油菜杂种优势利用研究。

通讯作者:董军刚(1972-),男,陕西岐县人,讲师,博士,主要从事油菜遗传育种及资源创新工作。

蓝型油菜 Ougra CMS 的恢复系就成为油菜萝卜质雄性不育三系利用的重点^[7]。1983 年 Pelletier 等^[8]通过细胞质融合将萝卜中的恢复基因转移到甘蓝型油菜中,解决了甘蓝型油菜萝卜质雄性不育系找不到恢复系的世界性难题,实现了甘蓝型油菜萝卜质雄性不育系、保持系和恢复系三系配套。研究表明,Delourme 和 Giancola 等^[9-10]把恢复基因从萝卜中导入油菜的同时也引入了位点两侧冗余的萝卜基因组信息,导致了恢复系农艺性状不良和籽粒硫苷含量增加,连锁基因对恢复材料的正常表现仍存在明显影响。2005 年 Primard-Brisset 等^[11]通过辐射处理重组恢复基因,育成了新一代恢复系 R2000,使得甘蓝型油菜 Ogu CMS 杂交种开始在欧洲得到广泛的应用。先锋国际良种公司^[12]创制了具有缩短的 *Raphanus* 片段(SRF)的新的芸薹属 *Ogura* 恢复系,硫苷含量较法国农业科学院的 INRA 更低,使得 *Ogura* CMS 在加拿大得到快速推广。国内 1995 年李旭峰等^[13]用油菜和蓝花子远缘杂交获得的杂交种与油菜连续回交得到异附加材料 Ad-6(F_5),测交结果表明,Ad-6 能够恢复 *Ogura* CMS 的育性,但由于导入油菜的外源基因较多,出现了开白花、生育期长等性状,限制了 *Ogura* CMS 在杂交油菜商品化生产中的应用。2010 年文雁成等^[14]通过 10 年多的自交和测交,从甘蓝型油菜萝卜质雄性不育掺和型杂交种 Corrida 中筛出了萝卜质不育系恢复系 R2008,但是 R2008 存在生育期长、芥酸和硫甙含量高、结角率低、角粒数少、冻害严重等缺点,也限制了在生产实践中的利用。2012 年 Chen 等^[15]以萝-蓝(*Raphanobrassica*, $2n=58$)为供体材料,利用嫁接导入外源恢复基因,育成甘蓝型油菜 Ogu CMS 纯合恢复材料 CLR650,其萝卜片段长度短于国外同类恢复系 R113,但该恢复材料的硫苷含量较高,也需要通过进一步改良才能为生产实践利用。鉴于国外对育成的恢复材料长期实施专利保护,国内拥有能够用于油菜种商品化生产的自主知识产权的 Ogu CMS 恢复材料还很少,这是阻碍 Ogu CMS 在我国应用的主要障碍。

本研究对西北农林科技大学油菜研究中心课题组选育的甘蓝型 Ogu CMS 的 13 个恢复材料(1575R)通过已报道的基于 Ogu CMS 恢复基因 *Rfo* 特异性分子标记、*Rfo* 连锁的萝卜标记进行分子标记和 SRF 系特异性标记的检测,根据分子标记的有无与国外已报道的恢复系 RRH1、R113、R2000、SRF 系和 NW1717 进行比较鉴定。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料是董振生研究员通过将已有的 1 个纯合恢复材料(RR)与 5 个性状优良的甘蓝型油菜(HD-1、HD-2、HD-3、HD-4、HD-5)杂交进行改良,选择形态和长势上与母本不同的恢复材料,用西北农林科技大学油菜研究中心课题组已报道的甘蓝型油菜萝卜质不育系 1575A^[16]与其杂交,选取育性完全恢复的 F_1 自交代,直至育性再无分离,最终选取了 F_6 的 13 个单株的幼嫩叶作为本试验的试验材料 1575R。编号分别为 1575R-1、1575R-2、1575R-3、1575R-4、1575R-5、1575R-6、1575R-7、1575R-8、1575R-9、1575R-10、1575R-11、1575R-12、1575R-13。(图表中所对应的编号为:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13)

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 采用 CTAB 法:取幼嫩叶片约 0.5 g 于研钵中,加入 2% CTAB 800 μ L,快速研磨成浆,65 $^{\circ}$ C 水浴 60 min,每隔 10 min 轻摇一次。加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)摇匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液于离心管中,重复抽提 1 次,加入冰冻无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min。12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,用漂洗液(75%乙醇,95%乙醇)分别清洗沉淀物 2 次,沉淀物风干后加入 ddH₂O 100 μ L, -20 $^{\circ}$ C 冰冻保存。

1.2.2 分子标记检测 PCR 扩增:参考 Hu 等^[17]在文献中所列举的基于 Ogu CMS 恢复基因 *Rfo* 特异性分子标记引物(BnRFO-AS2F/BnRFO-AS2R)、Primard-Brisset 等^[11]文献公开的 *Rfo* 连锁的特异性分子标记(ScH03、ScA14、SG34、BolJon、PGLint)和先锋国际良种公司^[12]专利中公开的特异性标记引物对恢复材料的 13 个单株进行分子标记检测,以本课题已有的 4 个不育系(S1、S2、S3、S4),4 个保持系(M1、M2、M3、M4)为对照,由于受专利的保护,检测结果直接与 RRH1、R113、R2000、SRF 系、NW1717 进行比对。所用的引物都是由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 反应体系:模板 DNA(80~100 ng/ μ L)0.5 μ L, Reaction Mix 5.0 μ L(含 DNA Polymerase, 2 \times PCR Buffer, 3 mmol/L MgCl₂ 和 400 μ mol/L dNTP Mix), 加灭菌 ddH₂O 补足 10 μ L。PCR 热循环参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共计 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

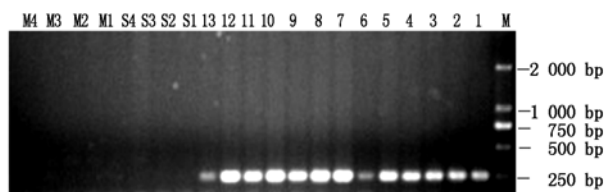
琼脂糖检测:将扩增产物加样在 1.5% 琼脂糖

凝胶上,1% TAE 电极缓冲液电泳(20 W,0.5 h)。EB 染色 15 min,置于凝胶成像仪上照相并保存图片。

2 结果与分析

2.1 1575R 恢复基因 *Rfo* 的鉴定

选取 Hu 等^[17]在文献中所列举的基于 Ogu CMS 恢复基因 *Rfo* 特异性分子标记引物(BnRFO-AS2F/BnRFO-AS2R;CATGCTTCGATCTCGTCCTTTA/GGTAACAACATCAGGGTGGAGT),对恢复材料 1575R 的 13 个单株进行检测,结果显示所有材料均呈阳性反应,而对照 4 个保持系、4 个不育系都是阴性反应,从分子水平说明了恢复材料 1575R 含有 Ogu CMS 恢复系恢复基因 *Rfo*(图 1)。



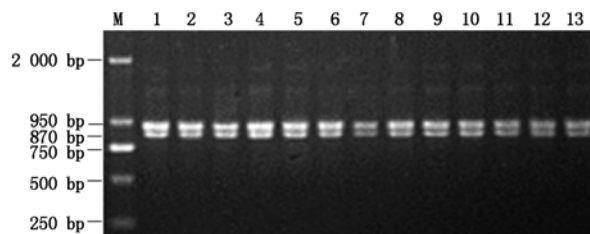
M. DM2000;1~13. 1575R;S1~S4. 不育系;M1~M4. 保持系。
M. DM2000;1~13. 1575R;S1~S4. Sterile line;M1~M4. Maintainer line.

图 1 标记 BnRFO-AS2F/BnRFO-AS2R PCR 扩增结果

Fig.1 PCR products amplified by the primers (BnRFO-AS2F/BnRFO-AS2R) in different materials

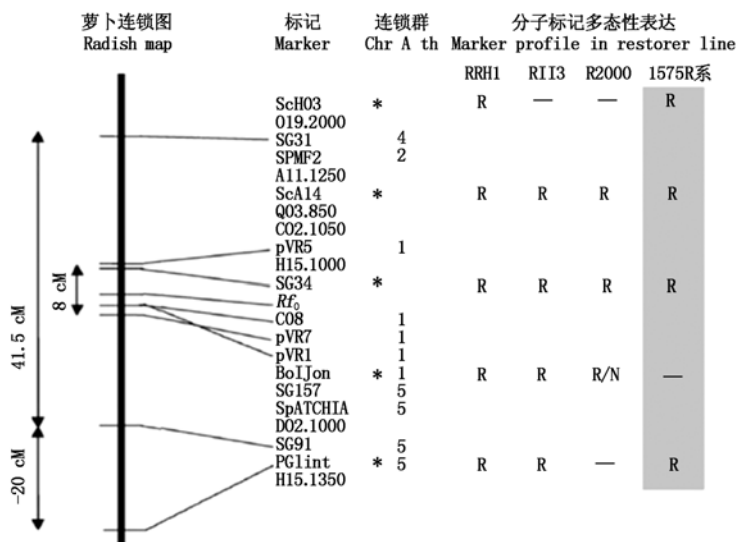
2.2 与 Ogu CMS 恢复基因 *Rfo* 连锁的萝卜分子标记检测

选取 Primard-Brisset 等^[11]文献中公开的 *Rfo* 连锁标记的引物(ScH03、ScA14、SG34、BolJon、PGLint)对恢复材料 1575R 的 13 个单株进行检测,将 PCR 扩增结果与 Primard-Brisset 等^[11]在文献中列举的恢复基因 *Rfo* 连锁分子标记图(RRH1、R113、R2000)进行比较,发现恢复材料 1575R 的 13 个单株均含有分子标记 ScH03、ScA14、SG34、PGLint,同时缺少了 RRH1、R113、R2000 共有的标记 BolJon(950 bp 来源于甘蓝类的 C 基因组,870 bp 来源于白菜类的 A 基因组。600 bp 是萝卜渐渗片段,即整合至油菜基因组的与 *Rfo* 连锁的萝卜染色体片段成分)。由图 2,3 初步说明恢复材料 1575R 可能与 RRH1、R113、R2000 是不同的。



M. DM2000;1~13. 1575R。

图 2 标记 BolJon PCR 扩增结果
Fig.2 PCR products of 1575R amplified by the primer (BolJon)



1. 白色部分为 Primard-Brisset 等^[11]文献结果;灰色部分为 1575R PCR 扩增结果;
2. R. 含有萝卜片段;- . 不含有萝卜片段;R/N. 既包含萝卜片段又包含原来恢复系缺失的油菜片段。

1. The white part in the graphicsis is the result on the literature(Primard-Brisset *et al*)^[11];The grey part in the graphicsis is the result of molecular analysis to 1575R;2. R. Presence of a radish fragment; - . Absence of the radish fragment;R/N. Presence of a radish fragments and of a *B. napus* fragment that was originally absent from the restorers.

图 3 恢复基因连锁分子标记比较

Fig.3 Comparison of molecular markers linked with fertility-restoring gene

2.3 与具有缩短的萝卜片段(SRF)的芸薹属 *Ogura* 恢复系^[12]的比较结果

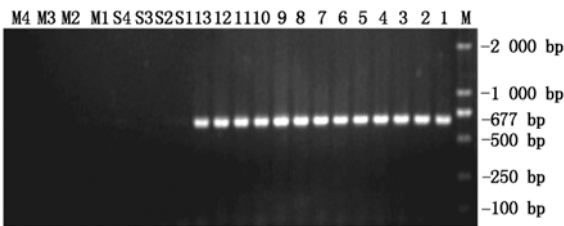
SRF 系是美国先锋国际良种公司专利保护的一

个芸薹属 *Ogura* 恢复系,该新的系统缺乏 OPC02 标记并能够在 *Ogura* 细胞质雄性不育(CMS)植物中恢复育性。由于缺少 SRF 系和 NW1717,分子标记检

测结果直接与专利中所列举的分子标记结果 (NW1717、SRF 系) 进行比对。试验结果 (图 4、表 1) 初步表明, 恢复材料 1575R 的分子标记结果与 NW1717 相同, 均含有标记 OPC02, 初步说明 1575R 可能与 NW1717 有着相近的同源关系, 有可能是与 SRF 系不同的恢复材料。

专利中同样给出了与法国农业科学院的 Ogu CMS 恢复材料的比较结果 (表 1), 从结果中可知恢复材料 1575R 比恢复材料 R2000、R211 缺少 E33M47、E32M50、OPN20、OPH15、IN6RS4、E33M58 这 6 个标记; 比恢复材料 R113 缺少 E33M47、E32M50、OPN20、OPH15、IN6RS4、E33M58、E33M59A、E33M59B 这 8 个标记, 结合与 *Rfo* 连锁的萝卜标记的

结果可以初步说明, 1575R 是有别于法国农业科学院的同类恢复材料 R2000、R211、R113。



M. DM2000; 1 ~ 13. 1575R; S1 ~ S4. 不育系; M1 ~ M4. 保持系。
M. DM2000; 1 ~ 13. 1575R; S1 ~ S4. Sterile line; M1 ~ M4. Maintainer line.

图 4 标记 OPC02 PCR 扩增结果
Fig. 4 PCR products amplified by the primers (OPC02) in different materials

表 1 选择的 Ogu 恢复材料之间的关键的 *Rf* 标记谱

Tab. 1 Selected key *Rf* markers of Ogu restorers

标记组 Marker groups	Rf 标记 Rf markers	1575R	SRF- R1439	SRF- R1815	SRF- R1931	NW171	R2000- INRA	R211- INRA	R113- INRA	NW3002 (R40)
I	RMA01	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	RMA02	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	RMA08	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	RMA10	1	0	0	0	1	1	1	1	1
II	RMB01	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	E35M62	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMB02	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMB04	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMB08	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMB10	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	OPF10	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMB12	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMC01	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMC02	1	1	1	1	1	1	1	1	1
III	E38M60	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMC08	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RMC09	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	RMC11	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	RMC15	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	RMC16	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	RMC17	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	RMC19	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	RMC21	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	RMC23	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	RMC24	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	OPC02	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	RMC25	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	RMC27	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	RMC29	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	RMC31	1	0	0	0	1	1	1	1	1
	RMC32	1	0	0	0	1	1	1	1	1
IV	E33M47	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	E32M50	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	OPN20	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	OPH15	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	IN6RS4	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	E33M58	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	E32M59A	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	E32M59B	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	OPH03	0	0	0	0	0	0	0	0	1

注: 1. 表示含有此标记; 0. 表示没有此标记。
Note: 1. Stands for containing the marker; 0. stands for without containing the marker.

3 结论与讨论

3.1 结论

本研究通过基于对 Ogu CMS 恢复基因 *Rfo* 特异性分子标记进行检测,表明 1575R 的 13 个恢复材料均含有 Ogu CMS 的恢复基因 *Rfo*;用 5 个与 *Rfo* 连锁的分子标记 (ScH03、ScA14、SG34、BolJon、PGlint) 对 1575R 进行检测,表明恢复材料的 13 个单株均含有 ScH03、ScA14、SG34、PGlint 4 个标记,而缺少了 BolJon 标记,初步表明 1575 系可能是与 RRH1、R113、R2000 不同的恢复材料。用先锋国际良种有限公司在专利中所列举的标记检测表明,恢复材料 1575R 可能与先锋公司的 SRF 系是不同的,而可能与 NW1717 有着相近的同源性。

3.2 讨论

本研究通过分子标记对本课题组选育的 Ogu CMS 恢复材料 1575R 进行检测,结果表明,1575R 缺少 RRH1、R113 和 R2000 共有的 BolJon 标记,初步说明 1575R 有可能有别于法国农业科学院的 Ogu CMS 恢复材料;因为只是与文献中所提供的分子标记结果进行对比,所以不能完全确定 1575R 与法国农科院是否属于不同的恢复材料。试验结果的进一步确认需要以法国农科院的恢复材料为对照。

同时,1575R 与先锋国际良种有限公司专利中所列举的 Ogu CMS 恢复材料 NW1717 所含有的标记结果相同,因此初步认定 1575R 有可能与 NW1717 有着相近的同源关系,因为 1575R 系的 13 个恢复材料都来自于 1 个亲本恢复材料 RR,从表 1 可以看出,杂交重组对恢复材料 RR 的改良效果很有限,RR 可能与 NW1717 有着相同的来源。

参考文献:

- [1] Ogura H. Studies on the new male sterility in Japanese radish, with special references to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seed [J]. Mem Fac Agric Kagoshima Univ, 1968, 6(2): 39–78.
- [2] Brown G G, Formanova N, Jin H, et al. The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats [J]. Plant Journal, 2003, 35(2): 262–272.
- [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] Bonhomme S, Budar F, Lancelin D, et al. Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in hybrids [J]. Molecular & General Genetics, 1992, 235(2): 340–348.
- [5] 王保仁, 常桂菊, 戴玉池. 甘蓝型油菜萝卜细胞质雄性不育系的研究 [J]. 中国油料, 1989(4): 3–6, 8, 105.
- [6] Bannerot H, Boudidard L, Chupeau Y. Unexpected difficulties Met with the radish cytoplasm in *B. oleracea* [J]. Eucampia Cruciferae Newsletter, 1977(2): 16.
- [7] 王俊生, 范小芳, 谭光轩, 等. 甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系的选育 [J]. 分子植物育种, 2011, 9(5): 617–622.
- [8] Pelletier G, Primard C, Vedel F et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1983, 191: 244–250.
- [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(4): 741–748.
- [10] Giancola S, Marhadour S, Desloire S, et al. Characterization of a radish introgression carrying the Ogura fertility restorer gene *Rfo* in rapeseed, using the Arabidopsis genome sequence and radish genetic mapping [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(8): 1442–1451.
- [11] Primard-Brisset C, Poupard J P. 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.
- [12] 先锋国际良种公司. 具有缩短的 *Raphanus* 片段 (SRF) 的新的芸薹属 *Ogura* 恢复系 [P]. 中国专利, 200980109801.9, 2011–06–01.
- [13] 李旭峰, 杨毅, 王幼平, 等. 油菜染色体工程研究—蓝花子特性导入油菜 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 1995, 5(5): 599–604.
- [14] 文雁成, 张书芬, 王建平, 等. 甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系的筛选和初步研究 [J]. 华北农学报, 2010, 4(4): 102–106.
- [15] Chen W J, Li M, Wang T H, et al. Development of new restorer materials with Ogu CMS in *Brassica napus* [J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 14(1): 18–25.
- [16] 王一峰, 董振生, 董军刚, 等. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育材料 1575A 的分子鉴定 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(9): 1760–1765.
- [17] Hu X E, Sullivan-Gilbert M, Kubik 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(4): 663–674.