

大白菜雄性核不育基因的染色体定位及 AFLP 分子标记筛选

袁 鹤, 张成合, 刘海河, 轩淑欣, 李晓峰, 申书兴

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

摘要: 【目的】基因定位是遗传研究的重点内容,也是育种工作的重要基础。本研究以大白菜雄性不育两用系‘大阳 AB 系’和大白菜系列初级三体为材料,对决定大白菜雄性不育性的核基因(ms)进行染色体定位和分子标记筛选,旨在为其分子克隆和遗传利用奠定基础。【方法】基因的染色体定位采用初级三体遗传分析和 χ^2 测验法,分子标记采用 AFLP 分析方法。【结果】大白菜‘大阳 AB 系’的雄性不育系(msms)×大白菜系列初级三体(Tri-1、Tri-2、Tri-3、Tri-4、Tri-5、Tri-6、Tri-7、Tri-8、Tri-9)的 9 个杂交组合中, F₁均为可育株;从 F₁选出三体植株进行自交和测交,其自交子代(F₂)和测交子代(Tc)中可育株与不育株的分离比例,只有 Tri-4 表现为 15.5 : 1 (F₂)和 3.24 : 1 (Tc)、不符合孟德尔的单基因遗传分离比例(3 : 1 和 1 : 1),其它三体在 2.60 : 1 ~ 3.76 : 1 (F₂)和 0.81 : 1 ~ 1.48 : 1 (Tc)、均符合孟德尔的单基因遗传分离比例(3 : 1 和 1 : 1),这表明该雄性不育性的遗传与 Tri-4 的遗传表现一致,即确定该雄性不育性的基因位于大白菜 4 号染色体上。基于染色体和染色体单体分离的三体遗传分析表明,该雄性不育基因位于 4 号染色体的近着丝点区域,通过对 124 个 AFLP 引物组合的筛选,初步获得了一个与雄性核不育基因位点连锁的 AFLP 标记 E34M49(398 bp),遗传距离约为 1.2 cM。【结论】利用初级三体遗传分析首次将大白菜雄性核不育基因定位在第 4 号染色体上。

关键词: 大白菜; 初级三体; 雄性不育; 基因定位; AFLP 标记

Chromosomal Location and AFLP Marker Screening of Genic Male Sterile Gene in Chinese Cabbage

YUAN He, ZHANG Cheng-he, LIU Hai-he, XUAN Shu-xin, LI Xiao-feng, SHEN Shu-xing

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei)

Abstract: 【Objective】Chromosome localization of genes is an important work for genetic study and breeding practice. In this paper Dayang AB line and trisomics of Chinese cabbage were used for assigning the male sterile gene to a particular chromosome and screening the molecular markers linked to the locus. 【Method】Locating the male sterile gene to a particular chromosome was conducted by primary trisomic analysis and χ^2 test, and screening the molecular markers linked to the gene locus by AFLP techniques. 【Result】All F₁ progenies in the nine combinations derived from sterile line × Tri-1 to sterile line × Tri-9 were male fertile. This indicated that the male fertility was dominant to the sterility in Chinese cabbage Dayang AB line. Selecting the trisomic(2n+1) plants from each F₁ progenies and being selfed or test-crossed to the sterile line, and the results showed that only Tri-4 combination displayed 15.5 : 1 segregation proportion of male fertile plants to male sterile plants in F₂ and 3.24 : 1 in Tc (test-cross), which disobeyed Mendelian segregation ratios for a monogenetic factor, while other combinations varied from 2.60:1 to 3.76 : 1 in F₂ and 0.81 : 1 to 1.48 : 1 in Tc, which fitted Mendelian segregation proportions (3 : 1 and 1 : 1) for a monogenetic factor. These results indicated that the gene controlling the male sterility of Chinese cabbage Dayang AB line was associated with trisomic 4, i.e. the gene was located on the chromosome 4. Further trisomic analysis based on the chromosomal segregation (assuming the gene closely linked to the centromere) and on the chromatid segregation(assuming the gene apart from the centromere) showed that the gene was closer to the centromere. Furthermore, an AFLP marker (E34M49) linked to the sterile gene was preliminarily screened out from 124

收稿日期: 2008-08-28; 接受日期: 2008-10-29

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2006000450)

作者简介: 袁 鹤(1983-), 女, 河北承德人, 硕士研究生, 研究方向为分子细胞遗传学。Tel: 0312-7528315; E-mail: heyuan-1212@163.com。

通信作者张成合(1953-), 男, 河北唐山人, 教授, 研究方向为蔬菜遗传育种。Tel: 0312-7528315; E-mail: zhangchenghe06@126.com

random primers. 【Conclusion】 Using primary trisomic analysis and molecular screening techniques, the sterile gene of Chinese cabbage was assigned to chromosome 4 and an AFLP marker (398 bp) linked to the locus was obtained preliminarily.

Key words: Chinese cabbage(*Brassica rapa* L. syn. *B. campestris* L.); primary trisomics; male sterility; gene location; AFLP marker

0 引言

【研究意义】大白菜 (*Brassica rapa* L. syn. *B. campestris* L.) 原产中国, 是重要的蔬菜作物, 也是杂种优势利用非常广泛的蔬菜作物种类之一。利用雄性不育系进行大白菜杂交制种具有成本低、纯度高、突出优点, 因此对大白菜雄性不育的研究和利用一直受到国内外研究者的重视。本研究对大白菜雄性核不育基因进行染色体定位和分子标记筛选, 旨在为其雄性不育性的基因克隆及其在遗传改良中的应用奠定基础。【前人研究进展】关于大白菜雄性不育性的选育和利用已有许多研究报道^[1-7]。随着分子生物学的发展, 分子标记和克隆技术已用于大白菜雄性不育性的研究, 如沈向群等^[8]对显性核不育大白菜‘AB712’进行了 RAPD 分析, 筛选出了与核不育基因紧密连锁的 RAPD 标记; 张战凤等^[9]利用 PCR 技术从大白菜新型胞质雄性不育材料 CMS7311 的线粒体基因组中扩增出与胞质雄性不育相关的片段, 并进行了克隆测序; 赵利民等^[10]根据 orf138 的保守序列设计引物, 以大白菜萝卜胞质雄性不育系 RC7 的 mtDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增出大小为 588 bp 的特异条带, 可编码 75 个氨基酸, 定名为 orf75; 张少丽等^[11]对大白菜温敏雄性不育系的育性转化相关基因进行了 cDNA-AFLP 分析。但迄今对大白菜雄性核不育基因的染色体定位研究国内外尚未见报道。【本研究切入点】基因定位是遗传学研究的重点内容, 也是基因克隆和作物育种的重要基础。为促进大白菜基因定位研究, 申书兴等创建了大白菜系列初级三体^[12], 为大白菜雄性核不育基因的染色体定位提供了关键遗传材料。【拟解决的关键问题】利用大白菜系列初级三体, 通过三体遗传分析和 χ^2 测验将大白菜雄性核不育基因定位到相应的染色体上, 并筛选与之连锁的分子标记, 建立基因位点及其分子标记与染色体的连锁关系, 为基因克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为大白菜雄性不育两用系‘大阳 AB 系’,

由河北农业大学园艺学院遗传育种室提供。该材料的雄性不育性受隐性单基因控制, 不育株的基因型为 (msms), 可育株的基因型为 (Msms)。经过 10 几年的回交 (msms × Msms) 选育, 不育系 (A) 与可育系 (B) 除育性差异外, 其它性状整齐一致, 遗传背景基本相同。不育系 (msms) × 可育系 (Msms) 的子代育性分离比例为 1 : 1, 可育系 (Msms) 自交呈 3 : 1 分离, 遵循孟德尔的遗传分离规律。大白菜系列初级三体材料 (Tri-1、Tri-2、Tri-3、Tri-4、Tri-5、Tri-6、Tri-7、Tri-8、Tri-9、Tri-10) 由河北农业大学园艺学院遗传育种室选育获得, 在试管内继代繁殖保存。

试验所用的 AFLP 接头、引物、EcoR I 和 Mse I 内切酶购自上海生工生物工程公司, T₄ 连接酶、dNTP、Taq 酶购自宝生生物工程 (大连) 有限公司, 其它药剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 雄性不育基因的染色体定位 2006 年 1 月中旬, 大白菜雄性核不育材料‘大阳 AB 系’播种于阳畦, 15 d 后大白菜系列初级三体的生根试管苗移栽至阳畦, 自然通过春化阶段。3 月初分别定植到田间, 开花前罩纱网防虫、防风。初花期拔除‘大阳 AB 系’中的雄性可育株 (B), 保留雄性不育株 (A), 然后分别与各初级三体杂交, 共 10 个杂交组合 (A × Tri-1、A × Tri-2、A × Tri-3、A × Tri-4、A × Tri-5、A × Tri-6、A × Tri-7、A × Tri-8、A × Tri-9、A × Tri-10)。翌年, 将各 F₁ 子代分区播种和定植, 待现蕾后按组合、分单株选取大小适宜的花蕾于 Carnoy 液 (95%乙醇 : 冰醋酸 = 3 : 1) 中固定, 常规压片法制片, PIHCH (丙酸-铁-水合三氯乙醛-苏木精) 染色液染色, Olympus BH-2 光学显微镜观察, 选取染色体分散的终变期、中期 I 和后期 I 进行染色体计数, 从各三体杂交组合的 F₁ 群体中选出三体植株, 分别进行自交和测交 (不育系 × F₁ 三体植株); 将 F₁ 的自交种子 (F₂) 和测交种子 (Tc) 按小区种植, 待开花后统计各组合 F₂ 和 Tc 群体中的可育株数和不育株数, 然后计算分离比例, 进行遗传分析和 χ^2 测验, 并依据分析和测验结果确定被测基因所位于的染色体及其和着丝点的大致距离。

1.2.2 AFLP 分子标记 基因组 DNA 提取: 于开花初

期, 对‘大阳 AB 系’ 1 : 1 分离群体进行挂牌标记, 分为不育株和可育株两组, 每组 48 株。按单株剪取嫩叶, 用改良 CTAB 法提取核基因组 DNA。各取 5 个不育单株或可育单株的 DNA 等量混合, 构建不育池和可育池, 其它单株的 DNA 用于单株检测、估算遗传距离。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度。

AFLP 分析: AFLP 反应参照 Thomas 等的方法^[13]。酶切采用 *EcoR* I / *Mse* I 双酶切, 预扩增选用无选择性碱基引物, 选择性扩增选用含有 3 个选择碱基的引物。PCR 产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 80 W 恒功率电泳 2 h, 银染后观察。

差异条带的回收测序: 将差异条带回收, PCR 扩增后送上海生工测序。

遗传距离分析: 参照陆光远等的方法^[14], 用测交 (*msms* × *Msms*) 群体检测分子标记与目标性状的连锁遗传关系, 数据处理用 MAPMAKER/EXP Version 3.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 雄性核不育基因的染色体定位

表 1 大白菜 F_1 植株的育性及 $2n+1$ 植株的频率

Table 1 Fertility and rate of $2n+1$ plants in F_1 generation of Chinese cabbage

杂交组合 Combinations	可育株数 Fertile plants	不育株数 Sterile plants	$2n+1$ 株数 2n+1 plants	$n+1$ 雄配子传递率 Transmission rates of n+1 male gamete (%)	染色体相对长度 Chromosome relative length (%)
A × Tri-1	62	0	2	3.23	13.91
A × Tri-2	66	0	1	1.52	12.09
A × Tri-3	52	0	3	5.77	10.14
A × Tri-4	54	0	5	9.26	9.84
A × Tri-5	58	0	4	6.70	9.67
A × Tri-6	55	0	7	12.73	9.42
A × Tri-7	54	0	6	11.11	8.57
A × Tri-8	51	0	5	9.80	7.91
A × Tri-9	65	0	3	4.62	7.43
A × Tri-10	-	-	-	-	-

F_1 可育植株为经过染色体数目鉴定的株数

F_1 fertile plants listed in Table 1 were chromosome number identified

若被测基因不在三体染色体上则基因表现双体分离, 分离比例符合孟德尔的分离规律。若被测基因位于三体染色体上, 则基因表现三体分离, 分离比例不符合孟德尔的分离规律。由表 2 可见, 在 9 个三体杂交组合的 F_2 群体中, 只有 A × Tri-4 的可育株 : 不育株 =

2.1.1 F_1 代的育性表现及 $2n+1$ 植株频率 杂交结果表明, 除不育系 (A) × Tri-10 因不结籽未获得 F_1 子代外, 其它 9 个三体杂交组合的 F_1 子代全部为可育株, 表明大白菜‘大阳 AB 系’的雄性不育受隐性基因控制, 与预期结果一致。为准确地从 F_1 子代中选出三体 ($2n+1$) 植株, 进行自交、测交和了解三体植株的出现频率, 分别对 9 个杂交组合的 F_1 子代植株进行了染色体数目鉴定。大白菜三体植株 ($2n+1=21$) 的额外染色体在减数分裂中期 I 和后期 I 多呈游离和落后状态, 很容易进行鉴别。由表 1 可见, 在 9 个杂交组合的 F_1 子代中均以二倍体 ($2n=20$) 植株为主, 三体 ($2n+1$) 植株仅占少数, 即 $n+1$ 配子较 n 配子的传递率低得多。但 $n+1$ 配子的传递率因不同的三体而异, 在测定的 9 个三体中, $n+1$ 配子的传递率变动在 1.52%~12.73%, 其中 Tri-6 的传递率最高, Tri-2 的传递率最低, 平均为 7.19%。对 $n+1$ 雄配子的传递率与染色体的相对长度进行了相关分析。结果显示, 两者没有显著相关性 ($r=0.57695$, $t=1.867 < t_{0.05}=2.365$)。这说明大白菜初级三体额外染色体的传递率与其长度没有必然的内在联系。

2.1.2 F_2 代育性分析及 χ^2 测验 依据三体遗传原理,

20.25 : 1, χ^2 测验不符合孟德尔的单因子分离比例 (3 : 1); 其它组合的可育株:不育株的分离比例在 2.60 : 1~3.76 : 1, 均符合孟德尔的单因子遗传分离比例 (3 : 1)。这表明, 决定大白菜雄性不育的基因仅与 Tri-4 有关, 即该基因位于大白菜 4 号染色体上。

表 2 大白菜雄性不育性的自交遗传分析 (F₂)Table 2 Genetic analysis of male sterility in F₂ populations of Chinese cabbage

组合 Combinations	F ₁		F ₂		比例 Ratios	χ^2 值(3 : 1) χ^2 value
	可育株 Fertile plants	不育株 Sterile plants	可育株 Fertile plants	不育株 Sterile plants		
A×Tri-1	76	0	67	20	3.35 : 1	0.47
A×Tri-2	78	0	65	24	2.71 : 1	0.18
A×Tri-3	78	0	62	18	3.44 : 1	0.27
A×Tri-4	80	0	62	4	15.50 : 1	12.63
A×Tri-5	80	0	63	17	3.71 : 1	0.60
A×Tri-6	79	0	69	19	3.63 : 1	0.54
A×Tri-7	77	0	65	25	2.60 : 1	0.37
A×Tri-8	76	0	70	19	3.68 : 1	0.63
A×Tri-9	75	0	64	17	3.76 : 1	0.69

F₁ 可育植株为开花后的总株数。 $\chi^2_{0.05}=3.84$; $\chi^2_{0.01}=6.64$

F₁ fertile plants listed in Table 2 were Total plants after flowering. $\chi^2_{0.05}=3.84$; $\chi^2_{0.01}=6.64$

2.1.3 测交子代的育性分离及 χ^2 测验 由表 3 可见, 测交结果与自交的完全一致, 即只有 Tri-4 的测交子代不符合 1 : 1 的分离比例, 其它均符合 1 : 1 的分离比例, 进一步证实决定大白菜雄性不育的基因位于 4 号染色体上。

表 3 大白菜雄性不育性的测交遗传分析 (Tc)

Table 3 Genetic analysis of male sterility in test-cross populations of Chinese cabbage

组合 Combinations	测交子代 Test-cross generations			
	可育株 Fertile plants	不育株 Sterile plants	比例 Ratios	χ^2 值(1 : 1) χ^2 value
A×Tri-1	42	33	1.27 : 1	1.08
A×Tri-2	43	31	1.39 : 1	1.95
A×Tri-3	45	40	1.13 : 1	0.29
A×Tri-4	55	17	3.24 : 1	20.06
A×Tri-5	30	37	0.81 : 1	0.13
A×Tri-6	40	32	1.25 : 1	0.89
A×Tri-7	43	33	1.48 : 1	1.39
A×Tri-8	36	42	0.86 : 1	0.46
A×Tri-9	37	31	1.19 : 1	0.53

$\chi^2_{0.05}=3.84$; $\chi^2_{0.01}=6.64$

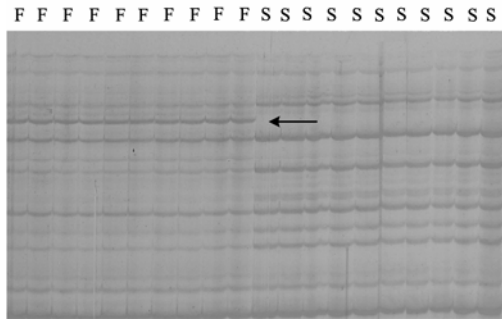
2.1.4 Tri-4 的遗传分析 基于染色体和染色单体两种分离方式对 Tri-4 杂合体 (MsMsms) 进行三体遗传分析, 以了解该基因位点和着丝点之间的遗传距离。基于染色体分离 (假定基因位点和着丝点较近, 其间不发生交换), 杂合体 (MsMsms) 产生的 n 和 n+1

配子种类及比例应为 2Ms : 1ms : 1MsMs : 2Msms; 基于染色单体分离 (假定基因位点和着丝点较远, 其间随机发生交换), 杂合体 (MsMsms) 产生的 n 和 n+1 配子种类及比例应为 10Ms : 5ms : 6MsMs : 8Msms : 1msms; 三体杂合体自交或测交的遗传分离比例与 n+1 配子的传递率有关, 经测定 Tri-4 产生的 n+1 雌、雄配子的传递率分别为 9.37% 和 9.26%。据此, 按染色体分离计算 F₂ 分离比例为 14.6 : 1, 按染色单体分离计算 F₂ 分离比例为 11.9 : 1。实际观测的分离比例为 15.5 : 1。 χ^2 测验表明, 两种理论分离比例与实际分离比例均符合, 但前者的符合度 ($\chi^2=0.013$) 较后者 ($\chi^2=0.26$) 高得多。由此可以推断, 该基因位点和着丝点之间的遗传距离相对较小。

2.2 AFLP 标记筛选

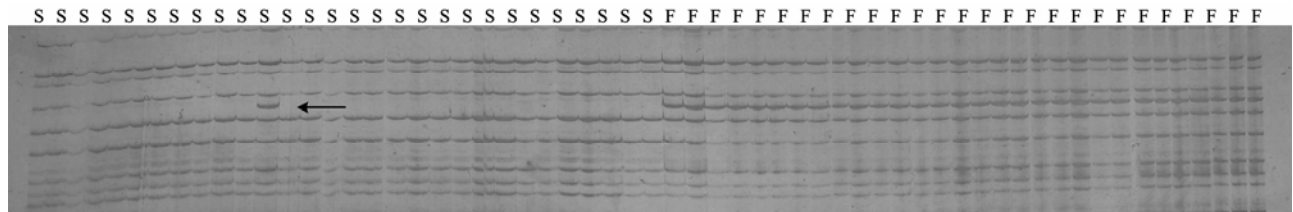
通过对 124 个引物组合的筛选, 扩增出总带数 1 608 条, 其中有 13 对引物扩增出差异带。在 13 对有效引物中, 只有 1 对引物 (E34/M49) 在回交群体中的不育和可育近等基因池中表现出稳定的多态性 (图 1), 显示大白菜 ‘太阳 AB 系’ 的育性基因与 E34/M49 连锁。用不育植株和可育植株进行单株检验, 结果表明, 在 43 个可育植株中均有 E34/M49 带出现, 在 43 个不育植株中有 1 株中扩增出了 E34/M49 带 (图 2)。用 MAPMAKER/EXP Version 3.0 软件对数据进行分析, 初步估算 E34/M49 标记与育性基因的遗传距离约为 1.2 cM。对差异片段进行了回收和测序, 结果显示特异扩增带 E34/M49 长度为 398 bp, 碱基序列如下:

5'-TCCATTCAATGGAGTAACCGTCAGGGCCG
 AGGCTCTTGTGAATGGCATGGAGAAAATTGTA
 CCCCTTATCTCCGGCTCAAGAACAGATCGAGAT
 AGATAAGCTTGTTGAATCTCCGAGCAACGAAAC
 GGGAGGAGGTCCTGAAGTTCGTCCATAGGAGCC
 ATTGAAATAGGGAGATCAGTAACACCCAAGATA
 TTCTGAAAATATTGAGCAGAGTGTGACTTGAGG
 TCGTCCGGTAGAGGAGATAACCAGATCATTCTCA
 TCCTTCAAATAGTGAATATGATTCCTAGTTACGT
 GCTGAGTGACCATACTGTGGTAGAAAACAGTAT
 TGCATCCCCTACGTCCGCCACTGAACACGCG
 AACGTTGTCTATAGAACTTTTCTTCTGCTGTTAC
 CGGG-3'。



箭头指差异带 Arrow showing a special band

图 1 E34/M49 对可育池 (F) 和不育池 (S) 的 AFLP 扩增
Fig. 1 Amplification pattern between male sterile bulk (S) and male fertile bulk with AFLP maker E34/M49 (F)



F: 可育株; S: 不育株 F: Male fertile plants; S: Male sterile plants

图 2 E34/M49 对 $msms \times Msms$ 回交后代的扩增结果

Fig. 2 AFLP amplification pattern with marker E34/M49 to individual plants of $msms \times Msms$

3 讨论

初级三体是用于基因定位的重要工具材料，但在利用三体进行基因定位时一般需要成套的三体系统，否则很难准确地将被测基因定位到具体的染色体上。此外，在进行雄性不育基因定位时由于雄性不育材料只能作母本，因此用作父本三体植株必须具备能产生有生活力花粉及其 $n+1$ 花粉能参与授粉受精的能力。然而三体植株的花粉生活力一般都很低，额外染色体主要通过雌配子传递给子代，如谷子三体的花粉生活力几乎为零^[15]。本研究利用的大白菜系列初级三体 (Tri-1~Tri-10)，除 Tri-10 因花粉败育未能与雄性不育材料杂交外，其它 9 个初级三体均能产生一定量的有生活力的花粉，而且 $n+1$ 花粉都有一定受精能力，从而保障了大白菜雄性不育基因的染色体定位研究。

利用三体进行基因定位的依据是三体杂合体 (如 AAa) 的自交或测交分离比例与双体杂合体 (如 Aa) 的显著不同。三体的这种特有的分离比例是不固定的，

它随着 n 和 $n+1$ 两种配子在减数分裂中的产生频率、在授粉受精中的传递率以及被测基因和着丝点之间的距离而变化。申书兴等曾对这套初级三体的减数分裂行为进行过系统观察，看到各初级三体在减数分裂后期 I 均以 $10/11$ ($n/ n+1$) 的分离方式为主， $10/11$ 分离的细胞频率最低的为 72.22% (Tri-5)，最高的为 95.10% (Tri-3)，平均为 87.68%^[16]，这表明大白菜各初级三体能产生比率大致相同的 n 和 $n+1$ 配子，即两种配子的形成频率对三体自交或测交分离比例的影响不大。但笔者对各初级三体 $n+1$ 配子的传递率测定表明，各初级三体 $n+1$ 配子的传递率均较低，如雌配子的传递率平均约为 10.35%，雄配子的约为 7.19%，因此它对三体自交或测交的分离比例会产生较大影响。本研究中若假定 Tri-4 的 $n+1$ 配子都能传递，即 n 和 $n+1$ 配子的传递率相同，则杂合体 ($MsMsms$) 基于染色体分离的 F_2 分离比例应为 35 : 1。若假定 Tri-4 的 $n+1$ 配子都不能传递，即 $n+1$ 配子的传递率为零，则杂合体 ($MsMsms$) 基于染色体分离的 F_2 分离比例

应为 8 : 1。按实测传递率计算的理论分离比例为 14.6 : 1。显然, 按 n+1 配子实测传递率计算的理论分离比例与实际观察到的分离比例 (15.5 : 1) 更为吻合。由此可见, 利用植物系列初级三体进行基因定位时对其 n+1 配子的传递率进行测定是必要的。但应该指出的是, 无论 n+1 配子的传递率如何, 三体的遗传分离比例都会与双体的明显不同, 也就是说无论 n+1 配子能否传递, 也不论三体杂合体的基因组成是单式 (Aaa) 还是复式 (AAa), 可以依据三体和双体 (Aa) 显然不同的分离比例, 通过遗传分析将被测基因定位到相应的染色体上。

三体遗传分析不仅可以确定被测基因与染色体的对应关系, 还可以了解被测基因和着丝点之间的大致遗传距离。本研究通过三体遗传分析, 初步确定大白菜‘大阳 AB 系’的育性基因 (Ms/ms) 和着丝点之间的遗传距离是相对较小的, 但该基因位于着丝点的哪一侧及其和着丝点之间的准确图距还有待进一步测定分析。

进行三体遗传分析需要较大的分离群体, 群体越大, 结果的可靠性越高。但由于大白菜三体材料的结实性较差、出苗率低等原因, 用于分析的 F₂ 群体偏小, 所以为弥补因 F₂ 群体偏小可能造成的试验误差, 试验中又进行了测交试验。尽管如此, 因群体偏小所引起的试验误差也是难以避免的。

筛选与雄性不育基因连锁的分子标记有助于雄性不育性的辅助选择, 在甘蓝中已筛选出了与显性雄性不育基因连锁的 RAPD 标记^[17]、SCAR 标记^[18]、ERPAD 标记^[19]、RFLP 标记^[20]和 AFLP 标记^[21], 并应用于甘蓝雄性不育性的辅助选择。本研究在对大白菜‘大阳 AB 系’雄性核不育基因进行染色体定位的基础上, 筛选出了一个与不育基因连锁的 AFLP 标记 (E34M49), 该标记的分子克隆及其应用尚有待深入研究。

4 结 论

本研究采用初级三体遗传分析等方法, 将大白菜‘大阳 AB 系’的雄性核不育基因 (ms) 定位于第 4 号染色体上, 并初步筛选了一个与该基因位点连锁的 AFLP 标记 E34M49 (398 bp), 为其分子克隆及其在遗传改良上的应用奠定了基础。

References

[1] 钮心恪, 吴飞燕, 钟惠宏, 李秀生. 大白菜雄性不育两用系的选育

及其利用. 园艺学报, 1980, 7(1): 25-31.

- Niu X G, Wu F Y, Zhong X H, Li X S. Selection and utilization of Chinese cabbage male sterile AB line. *Acta Horticulturae Sinica*, 1980, 7(1): 25-31. (in Chinese)
- [2] 张书芳, 宋兆华, 赵雪云. 大白菜细胞核基因互作雄性不育系选育及其应用模式. 园艺学报, 1990, 17(2): 117-125.
- Zhang S F, Song Z H, Zhao X Y. Breeding of interactive gene male sterile line in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.) and utilization model. *Acta Horticulturae Sinica*, 1990, 17(2): 117-125. (in Chinese)
- [3] 魏毓棠, 冯 辉, 张蜀宁. 大白菜雄性不育遗传规律的研究. 沈阳农业大学学报, 1992, 23(3): 260-266.
- Wei Y T, Feng H, Zhang S N. The inheritance of genic male sterility in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Journal of Shenyang Agricultural University*, 1992, 23(3): 260-266. (in Chinese)
- [4] Feng H, Wei Y T, Zhang S N. Inheritance of and utilization model for genic male sterility in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Acta Horticulturae*, 1995, 402: 133-140.
- [5] Feng H, Wei Y T, Ji S J, Jin G, Jin J S, Dong W J. Multiple allele model for genic male sterility in Chinese cabbage. *Acta Horticulture*, 1996, 467: 133-142.
- [6] 陈文辉, 方淑桂, 曾小玲. 大白菜核质互作型不育系 98-2 选育研究. 福建农业学报, 2000, 15(4): 22-25.
- Chen W H, Fang S G, Zeng X L. Breeding of Chinese cabbage male sterile line 98-2 with nucleo-cytoplasmic interactive type. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 2000, 15(4): 22-25. (in Chinese)
- [7] 杨皓宁, 冯 辉, 李承彧. 大白菜核不育复等位基因的鉴定与分布. 河南农业科学, 2008, (4): 87-90.
- Yang H N, Feng H, Li C Y. Identification and distribution of male sterile multiple alleles in Chinese cabbage. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2008, (4): 87-90. (in Chinese)
- [8] 沈向群, 杨文骏. 大白菜核基因显性雄性不育性育性恢复基因的 RAPD 标记. 园艺学报, 2004, 31(6): 731.
- Shen X Q, Yang W J. RAPD marker linked to the fertile restoring gene for the dominant genic male sterile lines in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(6): 731. (in Chinese)
- [9] 张战凤, 张鲁刚, 王 绮, 惠麦侠, 张明科. 大白菜胞质雄性不育系育性相关线粒体 DNA 片段的克隆及序列分析. 西北农业学报, 2006, 15(3): 112-115.
- Zhang Z F, Zhang L G, Wang Q, Hui M X, Zhang M K. Cloning and sequencing of a mitochondrial DNA fragment related to cytoplasmic male sterile line of Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2006, 15(3): 112-115. (in Chinese)

- [10] 赵利民, 陈夫贵, 巩振辉, 赵会芳, 柯桂兰. 大白菜雄性不育系 RC7 育性相关基因克隆与特性分析. 西北植物学报, 2008, 28(1): 7-11.
Zhao L M, Chen F G, Gong Z H, Zhao H F, Ke G L. Cloning and molecular identification of gene associated with CMS RC7 in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28(1): 7-11. (in Chinese)
- [11] 张少丽, 张鲁刚, 张 玉, 万恩梅, 惠麦侠, 张明科. 大白菜温敏雄性不育系育性转化相关基因的 cDNA-AFLP 分析. 西北植物学报, 2008, 28(4): 667-674.
Zhang S L, Zhang L G, Zhang Y, Wan E M, Hui M X, Zhang M K. cDNA-AFLP analysis of fertility change over genes related to thermo-sensitive TsCMS 7311 line of Chinese cabbage. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28(4): 667-674. (in Chinese)
- [12] 申书兴, 侯喜林, 张成合. 利用小孢子培养创建大白菜初级三体的研究. 园艺学报, 2006, 33(6): 1209-1214.
Shen S X, Hou X L, Zhang C H. A study on obtaining primary trisomics by the isolated microspore culture of autotetraploid Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(6): 1209-1214. (in Chinese)
- [13] Thomas C M, Vos P, Zabeau M, Jones D A, Norcott K A, Chadwick B P, Jones J D G. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (ALFP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*, 1995, 8(5): 785-794.
- [14] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育基因的 AFLP 标记. 作物学报, 2004, 30(2): 104-107.
Lu G Y, Yang G S, Fu T D. Identification of AFLP markers linked to the dominant genic male sterility gene in *Brassica napus* L. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(2): 104-107. (in Chinese)
- [15] 王润奇, 高俊华, 王志兴, 王志民. 谷子三体系列的建立. 植物学报, 1994, 36(9): 690-695.
Wang R Q, Gao J H, Wang Z X, Wang Z M. Establishment of trisomic series of millet. *Acta Botanica Sinica*, 1994, 36(9): 690-695. (in Chinese)
- [16] 申书兴, 侯喜林, 罗双霞. 大白菜初级三体的配子形成及传递率研究. 园艺学报, 2008, 35(9): 1285-1291.
Shen S X, Hou X L, Luo S X. Studies on the gamete formation and transmission rate of a set of primary trisomics in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(9): 1285-1291. (in Chinese)
- [17] 王晓武, 方智远, 孙培田, 刘玉梅, 杨丽梅. 一个与甘蓝显性雄性不育基因连锁的 RAPD 标记. 园艺学报, 1998, 25(2): 197-198.
Wang X W, Fang Z Y, Sun P T, Liu Y M, Yang L M. Identification of a RAPD marker linked to a dominant male sterile gene in cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 1998, 25(2): 197-198. (in Chinese)
- [18] 王晓武, 方智远, 孙培田, 刘玉梅, 杨丽梅, 庄 木. 一个用于甘蓝显性雄性不育基因转育辅助选择的 SCAR 标记. 园艺学报, 2000, 27(2): 143-144.
Wang X W, Fang Z Y, Sun P T, Liu Y M, Yang L M, Zhuang M. A SCAR marker applicable in marker assisted selection of a dominant male sterility gene in cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(2): 143-144. (in Chinese)
- [19] Wang X W, Fang Z Y, Huang S W, Sun P T, Liu Y M, Yang L M, Zhuang M. An extended random primer amplified region (ERPAR) marker linked to a dominant male sterility gene in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Euphytica*, 2000, 112: 267-273.
- [20] 刘玉梅, 方智远, Michael D McMullen, 庄 木, 杨丽梅, 王晓武, 张扬勇, 孙培田. 一个与甘蓝显性雄性不育基因连锁的 RFLP 标记. 园艺学报, 2003, 30(5): 549-553.
Liu Y M, Fang Z Y, McMullen M D, Zhuang M, Yang L M, Wang X W, Zhang Y Y, Sun P T. Identification of a RFLP marker linked to a dominant male sterile gene in cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(5): 549-553. (in Chinese)
- [21] 黄和艳, 张延国, 邓 波, 娄 平, 王晓武. 利用 AFLP 标记辅助甘蓝显性雄性不育高代回交系选择. 园艺学报, 2006, 33(3): 539-543.
Huang H Y, Zhang Y G, Deng P, Lou P, Wang X W. Application of AFLP markers in assisted selection of cabbage (*Brassica oleracea*) dominant male sterility high generation backcrosses. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33 (3): 539-543. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)