

萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 的高通量 SNP 标记开发及其应用

王庆彪, 张 丽*, 温常龙, 杨静静

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 蔬菜种质改良北京市重点实验室, 北京 100097)

摘 要: 利用萝卜 Ogura-CMS 保持系和恢复系育性恢复基因 *Rfo* 的序列, 开发了基于高通量竞争性等位基因特异性 PCR (KASP) 分型技术的 SNP 标记: *Rfo-SNP1*。利用该标记对 24 个萝卜品种的 304 个单株进行了育性恢复基因 *Rfo* 的基因型鉴定, 其中 289 株获得基因分型结果, 占整个群体的 95.07%。从分型结果看, 育性恢复基因 *Rfo* 的基因型为 *rfif* 的有 110 株 (占 36.18%), 基因型为 *RfRf* 和 *Rfirf* 的分别为 156 株 (占 51.32%) 和 23 株 (占 7.57%)。在 12 个品种中获得基因型为 *rfif* 的单株, 可作为保持系并用于不育系转育。利用 PCR-RFLP 标记和回交群体单株育性鉴定, 进一步证实 *Rfo-SNP1* 标记不但能够实现高通量检测, 而且能够实现萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 基因型的精准鉴定。目前利用该方法已成功转育了 6 套稳定遗传的雄性不育系及保持系。

关键词: 萝卜; Ogura-CMS; 育性恢复基因 *Rfo*; SNP 标记; 辅助选择

中图分类号: S 631.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 07-1309-10

Development and Application of High-throughput SNP Markers for Ogura-CMS Fertility Restorer Gene in Radish

WANG Qingbiao, ZHANG Li*, WEN Changlong, and YANG Jingjing

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing Key Laboratory of Vegetable Germplasm Improvement, Beijing 100097, China)

Abstract: Based on the nucleotide sequences of *Rfo* related to the Ogura-CMS fertility restorer gene in radish, the SNP (Single nucleotide polymorphism) marker named *Rfo-SNP1* was developed by use of KASP (kompetitive allele specific PCR) technology. The genotypes of fertility restorer gene in 24 radish varieties including 304 plants were identified using the *Rfo-SNP1* marker. The results showed that 289 plants were screened out accounting for 95.07% of the whole population. And 110 plants had the recessive homozygous genotype (*rfif*) taking up 36.18%. The dominant homozygous genotype (*RfRf*) and the heterozygous genotype (*Rfirf*) appeared respectively in 156 plants and 23 plants. In 23 fertile varieties, 12 varieties had the *rfif* genotype, which implied that the 12 varieties might be the candidates of maintainer lines for breeding sterile lines. The accuracy of *Rfo-SNP1* markers was further verified by PCR-RFLP and

收稿日期: 2017-03-31; 修回日期: 2017-07-12

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2014BAD01B08); 北京市农林科学院创新团队项目 (JNKYT201601)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangli@nrcv.org)

backcross populations. Six male sterile lines and maintainer lines of radish have been developed through this procedure.

Keywords: radish; Ogura-CMS; fertility restorer gene *Rfo*; SNP marker; assisted selection

雄性不育和自交不亲和利用是萝卜杂交育种的两个主要途径。与利用自交不亲和系相比,利用雄性不育系具有两个明显的优势,一是可以提高杂交种的纯度,二是可以避免亲本的丢失。在萝卜中已陆续发现了不同的雄性不育类型,如 Ogura、金花薹 48A、Kosena、NWB 和 DCGMS (Ogura, 1968; 何启伟 等, 1981; Ikegaya, 1986; Nahm et al., 2005; Lee et al., 2008), 其中应用最广泛且研究最深入的是 Ogura 细胞质雄性不育 Ogura-CMS (Yamagishi & Terchi, 1994, 1996, 2001; Yamagishi, 2004; Zhang et al., 2012)。Ogura-CMS 属质核互作雄性不育类型,其育性由线粒体嵌合基因 *orf138* 和细胞核育性恢复基因 *Rfo* (*orf687*, PPR-B) 共同控制 (Bonhomme et al., 1992; Koizuka et al., 2003)。在不育系中 ORF138 蛋白在线粒体内膜上积累,可能干扰其他线粒体基因 (*atp6*、*atp8*、*cox I* 等) 的功能,导致雄性不育的发生 (Duroc et al., 2005, 2009)。细胞核内育性恢复基因可恢复其育性,在欧洲萝卜、日本萝卜及中国萝卜品种中均发现了育性恢复基因 (Nieuwhof, 1990; Yamagishi, 1998; 张丽 等, 1999)。Brown 等 (2003)、Desloire 等 (2003) 分别在融合 Ogura 雄性不育细胞质的甘蓝型油菜和萝卜中克隆了 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo*, Koizuka 等 (2003) 也克隆了萝卜育性恢复基因 *orf687*, 二者为同一基因,编码一种包含 687 个氨基端的 PPR 蛋白 (pentatricopeptide repeat proteins, PPR), 能够阻止花药绒毡层中 ORF138 蛋白的合成,从而使雄性不育系恢复育性 (Uyttewaal et al., 2008; Qin et al., 2014)。进一步研究表明:与没有育性恢复功能 ORF687 蛋白相比,具有育性恢复功能的 ORF687 蛋白含有 4 个特殊的氨基酸 (Imai et al., 2002)。

雄性不育恢复基因的克隆为萝卜育性基因的鉴定、分子标记开发提供了基础。Yasumoto 等 (2008a, 2008b) 根据不育系和恢复系中 *Rfo* 基因的序列差异开发了 PCR-RFLP 标记,并用于研究恢复基因在日本野萝卜中的分布频率。在此基础上, Sun 等 (2012) 将该标记应用于萝卜雄性不育系的辅助选择。但 PCR-RFLP 标记需要结合 PCR 扩增、限制性内切酶消化和凝胶电泳过程,不但对 DNA 质量要求较高、经常由于反应条件不稳定造成精确度降低,而且不能实现高通量、大样本的检测。竞争性等位基因特异性 PCR (Kompetitive Allele Specific PCR, KASP) 分型技术,能够对基因组中 SNPs 和特定位点上的 InDels 进行精准的双等位基因判断,具有灵敏度高、高通量、低成本、快速等优点,是目前国际上 SNP 分型的主流方法之一,在人类疾病和哺乳动物研究中应用较多 (Rachit et al., 2014; Smith & Maughan, 2015)。中国国内也将其用于白菜 (只升华 等, 2016)、黄瓜 (Wen et al., 2015)、大麦 (张利莎 等, 2015) 等作物的遗传图谱构建、分子标记检测和种子纯度鉴定等方面。

本研究中基于 KASP 基因分型技术,开发萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 的 SNP 标记,研究恢复基因在萝卜品种中的分布,并用于萝卜雄性不育系的辅助选择,加速萝卜雄性不育系的转育。

1 材料与amp;方法

1.1 供试材料

供试萝卜材料 (表 1) 分为两部分, Rad1 ~ Rad24 用于育性恢复基因 *Rfo* 基因型的鉴定及不育系的转育,其中 ‘猷夏 37A’ 是来源于日本的 Ogura 类型雄性不育系,其他材料来源于中国和日本,

田间均表现可育; Rad25 ~ Rad35 为本课题组育种亲本材料(自交 8 代以上), 用于开发高通量 KASP 标记的验证分析。所有材料于 2014 年 1 月 10 日播种于温室, 低温春化后于 3 月 15 日定植于大棚, 每个品种种植 8 ~ 15 株。

表 1 试验材料来源、类型及育性
Table 1 The origin, variety types and fertility of radish cultivars or inbred lines used in the experiments

编号 Accession No.	品种或自交系 Cultivar and inbred lines	品种类型 Variety type	育性 Fertility or sterility	来源 Origin
Rad1	献夏 37A Kenga 37A	白萝卜 White radish	不育 Sterility	日本 Japan
Rad2	喜诺青 Xinuoqing	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad3	山东青 Shandongqing	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad4	露头青 Lutouqing	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad5	缸萝卜 Gangluobo	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad6	西星 5 号 Xixing 5	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad7	小青萝卜 Xiaoqingluobo	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad8	羊角青 Yangjiaoqing	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad9	卫青 Weiqing	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad10	翠帅 Cuishuai	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad11	清脆 50 Qingcui 50	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad12	翘头青 Qiaotouqing	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad13	绿玉 Lüyu	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad14	二年子大根 Ninengo Daikon	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad15	时无 Tokinashi	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad16	青宝夏 Qingbaoxia	白萝卜 White radish	可育 Fertility	中国 China
Rad17	玉观音 Yuguanyin	白萝卜 White radish	可育 Fertility	中国 China
Rad18	珍珠白雪 Zhenzhu Baixue	白萝卜 White radish	可育 Fertility	中国 China
Rad19	白玉秋 Baiyuqiu	白萝卜 White radish	可育 Fertility	中国 China
Rad20	大师 Daishi	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad21	新关 Niizeki	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad22	梅风 Umekaze	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad23	平安早太 Heianhayabuto	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad24	T1-155	白萝卜 White radish	可育 Fertility	中国 China
Rad25	FWB16-1	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad26	FWB16-2	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad27	FWB16-3	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad28	P12	白萝卜 White radish	可育 Fertility	韩国 Korea
Rad29	P14	白萝卜 White radish	可育 Fertility	韩国 Korea
Rad30	P19	青萝卜 Green radish	可育 Fertility	中国 China
Rad31	FW16-9	白萝卜 White radish	可育 Fertility	日本 Japan
Rad32	P23	白萝卜 White radish	可育 Fertility	中国 China
Rad33	P25	白萝卜 White radish	可育 Fertility	中国 China
Rad34	FW16-2	白萝卜 White radish	可育 Fertility	韩国 Korea
Rad35	FW16-11	白萝卜 White radish	可育 Fertility	韩国 Korea

1.2 DNA 的提取与常规 PCR 扩增

取植株新鲜叶片为试材, 利用 DNA 提取试剂盒 (QIAGEN, 德国), 按操作手册进行总 DNA 提取。

根据已发表的引物序列扩增萝卜 Ogura-CMS 胞质不育基因 *orf138* 和育性恢复基因 *Rfo* (Yamagish & Terachi, 2001; Koizuka et al., 2003; Yasumoto et al., 2008a)。PCR 反应总体积为 20 μL , 含有 12.9 μL ddH₂O, 2 μL 的 10 \times PCR Buffer (MgCl₂), 1.6 μL dNTPs (10 mmol \cdot L⁻¹), 上下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 μL *ExTaq* 酶 (2.0 U \cdot μL^{-1}), 2 μL DNA 模板 (40 ng \cdot μL^{-1}), 试剂购自 TaKaRa 公司。PCR 扩增程序包括: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min; 35 个循环, 每循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物。

1.3 RFLP 分析

根据 PCR 扩增结果, 选取具有恢复基因 *Rfo* 条带的扩增产物, 用限制性内切酶 *Ssp* I 进行消化。酶切反应体系为 20 μ L, 含有 11.5 μ L ddH₂O 水, 0.5 μ L 10 \times Buffer, 1.0 μ L *Ssp* I 内切酶 (5.0 U \cdot μ L⁻¹), 7.0 μ L PCR 扩增产物。37 $^{\circ}$ C 酶切消化 2 h, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 检测酶切带型。

1.4 适于高通量 KASP 基因分型的 SNP 标记开发

利用 NCBI 已公布的萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 的一对等位基因的序列信息, 即 *Rfo* (AJ535623) 和 *rfo* (AJ535624), 由 DNAMAN 软件完成序列比对。根据比对结果和发现的碱基差异设计适于 KASP 基因分型的 SNP 标记特异引物: SNP1-A1: 5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAGCTGCAGAAACATTTTATCAGAATG-3'; SNP1-A2: 5'-GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTTCAGCTGCAGAAACATTTTATCAGAATA-3'; SNP1-C: 5'-GAAAGGAAACAGATTTCGATGTGATATATAACA-3'。其中, 上游引物包括 SNP1-A1 和 SNP1-A2 两条序列, 3'端为等位变异碱基 (A 或 G), 5'端分别加上 FAM 和 HEX 荧光标签序列 (下划线部分); 下游引物为 SNP1-C。引物委托 LGC 公司 (LGC Genomics, 英国) 合成。

1.5 KASP 基因分型

KASP 基因分型 PCR 反应体系: 10 ng 基因组 DNA, 5 μ L KASP V4.0 2 \times Master Mix, 0.14 μ L KASP 72 \times assay mix, 加 ddH₂O 至 10 μ L (适于 96 孔板)。5 ng DNA, 2.5 μ L KASP V4.0 2 \times Master Mix, 0.07 μ L KASP 72 \times assay mix, 加 ddH₂O 至 5 μ L (适于 384 孔板)。其中, KASP V4.0 2 \times Master Mix 为 LGC 公司产品, 由荧光探针 A、荧光探针 B、淬灭探针 A 和淬灭探针 B, 以及高保真的 *Taq* 酶, dNTP 等组成。KASP 72 \times assay mix 由浓度为 100 μ mol \cdot L⁻¹ 的 SNP1-A1、SNP1-A2、SNP1-C 与 ddH₂O 按 12:12:30:46 的体积比混合得到。试验同时设置反应体系中不添加模板 DNA 的空白对照, 每个 PCR 板设置 1 个空白对照。

梯度 PCR 反应程序包括: 95 $^{\circ}$ C 变性 15 min; 10 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 61 $^{\circ}$ C (每循环降 0.6 $^{\circ}$ C) 退火 60 s; 26 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s。

采用双向单激发读板仪 PHERAstar 对 PCR 扩增产物进行扫描, FAM 激发波长为 485 nm, 发射波长为 520 nm, HEX 激发波长为 528 nm, 发射波长为 560 nm, 系统参比荧光 ROX 激发波长为 575 nm, 发射波长为 610 nm。

采用 KrakenTM 软件对双向单激发读板仪 PHERAstar 扫描数据分析: 聚合在接近 X 轴的显示蓝色的样本的基因型为连接 FAM 荧光标签序列的等位基因型, 聚合在接近 Y 轴上的显示红色的样本的基因型为连接 HEX 荧光标签序列的等位基因型, 中间显示绿色的样本的基因型为两种等位基因的杂合型, 显示粉色的样本可能由于 DNA 质量不好或浓度过低, 扩增产物没有被明确分型, 左下角显示黑色的样本为空白对照 (Rachit et al., 2014)。

2 结果与分析

2.1 萝卜育性恢复基因 *Rfo* 高通量 SNP 标记的开发

通过比对 *Rfo* (AJ535623) 和 *rfo* (AJ535624) 的序列发现, *Rfo/rfo* 基因 CDS 存在 11 个碱基变异, 且存在限制性内切酶 *Ssp* I 识别位点 (+353, +354)。针对 +354 (A-G) 位点开发适用于 KASP

基因分型的 SNP 标记 *Rfo*-*SNP1* (引物位置见图 1)。

```

Rfo GCAGATTCAGTGCAGACACAGTATCTCCCTTCTTACACATCCCATCTACGATTGTTCCATAAGTAATCTGGGTAGGCTGGAGACC 640
rfo GAAGATTCATGCAGACACAGTATCTCCCTTCTTACACATCCCATCTACGATTGTTCCATAAGTAATCTGGGTAGGCTGGAGACC 640
    * *****

Rfo ATCTTCCATCATCCGATCAAGCAGAGCTACGGCTTCGACAATTCTACCCTCGCGGCAAAGACCGTTCATCAAAGTGGTGAAGGTT 555
rfo ATCTTCCATCATCCGATCAAGCAGAGCTACGGCTTCGACAATTCTACCCTCGCGGCAAAGACCGTTCATCAAAGTGGTGAAGGTT 555
    *****

Rfo ACGACATTGGGCCTACATGTCGTTTCAAACATTTGATGAAAAAATCCAAGGCTTCAGAAACCTATCTTCCACACATAATCCAT 470
rfo ACGACATTGGGCCTACATGTCGTTTCAAACATTTGATGAAAAAATCCAAGGCTTCAGAAACCTATCTTCCACACATAATCCAT 470
    *****

Rfo GGAGCAGGGTGGTGAAGGTAACAACATCAGGGTGGAGTCCAAGCTTGGTGATCTTACCAATGTAGACAAAGCAAAGGGGAGCTT 385
rfo GGAGCAGGGTGGTGAAGGTAACAACATCAGGGTGGAGTCCAAGCTTGGTGATCTTACCAATGTAGACAAAGCAAAGGGGAGCTT 385
    *****

Rfo AGAGCAGCTGCAGAAACATTTTATCAGAATATTTGAAGCTGTATATATCACATCGAATCTGTTTCCTTTCATCTTCTGATAGAGA 300
rfo AGAGCAGCTGCAGAAACATTTTATCAGAATGTTGAAGCTGTATATATCACATCGAATCTGTTTCCTTTCATCTTCTGATAGAGA 300
    *****
    SNP1-A1/SNP1-A2 (22~48位碱基, 5'-3')          SNP1-C (5'-3')
    
```

图 1 等位基因 *Rfo/rfo* 序列比对结果及 SNP 位置

Fig. 1 Comparison of nucleotide sequences between *Rfo* and *rfo* alleles, and the SNP location

利用高通量 *Rfo*-*SNP1* 标记对 11 份亲本材料育性恢复基因 *Rfo* 的基因型进行鉴定, 结果显示, 在 KASP 基因分型聚类图中 Rad25、Rad26、Rad27 呈现蓝色 (G : G), Rad28 ~ Rad35 呈现红色 (A : A), 表明其 *Rfo* 基因的基因型分别为 *rfif* 和 *RfRf* (图 2)。

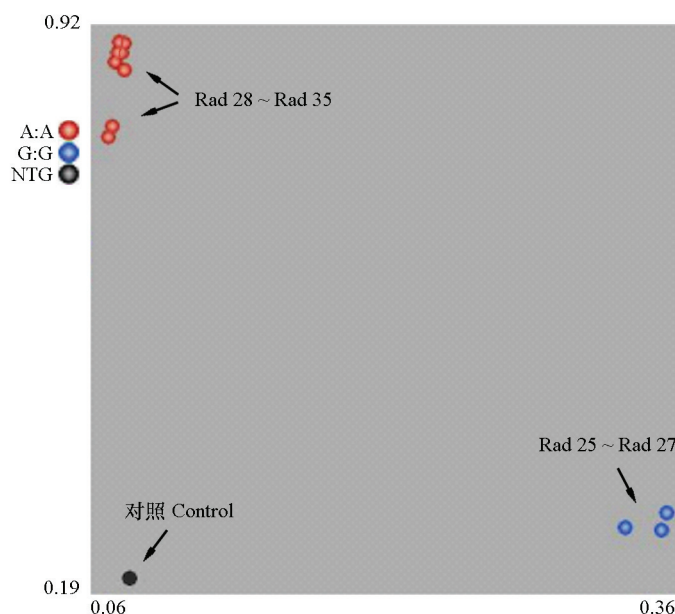


图 2 利用标记 *Rfo*-*SNP1* 对 11 份亲本材料进行 KASP 分型

红色点为基因型 A : A, 蓝色点为基因型 G : G, 黑色点 (NTG) 为空白对照。
 坐标轴内的每个点代表一个单株个体, 数据点可能存在重叠。

Fig. 2 KASP genotyping of 11 inbred lines by *Rfo*-*SNP1* marker

The red spot means the genotype A : A, the blue spot means the genotype G : G, The black spot (NTG) means blank control.
 These spots within the axis represent different single plant, and data spots may be overlapped.

2.2 萝卜育性恢复基因 *Rfo-SNP1* 标记的验证分析

为了验证本研究开发的高通量 KASP 标记的准确性, 利用 PCR-RFLP 标记对已有的萝卜亲本材料 (包括 Rad25 ~ Rad35, 田间均表现可育) 进行了育性鉴定。如图 3 所示, *orf138* 在材料 Rad28 和 Rad30 有扩增条带, 表明其具有不育胞质 (S); 育性恢复基因 *Rfo* 在 11 份亲本材料中均有扩增, 利用 *Ssp I* 酶切后, Rad25、Rad26、Rad27 获得 1 888 bp 和 414 bp 两条带, 表明其基因型为 *rfif*; Rad28 ~ Rad35 获得 1 544、414 和 344 bp 等 3 条带, 其基因型为 *RfRf*。结果表明高通量 *Rfo-SNP1* 标记、PCR-RFLP 标记和田间育性检测结果一致, 新开发的高通量 SNP 标记能够大规模应用于萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 的基因型鉴定与标记辅助选择育种。

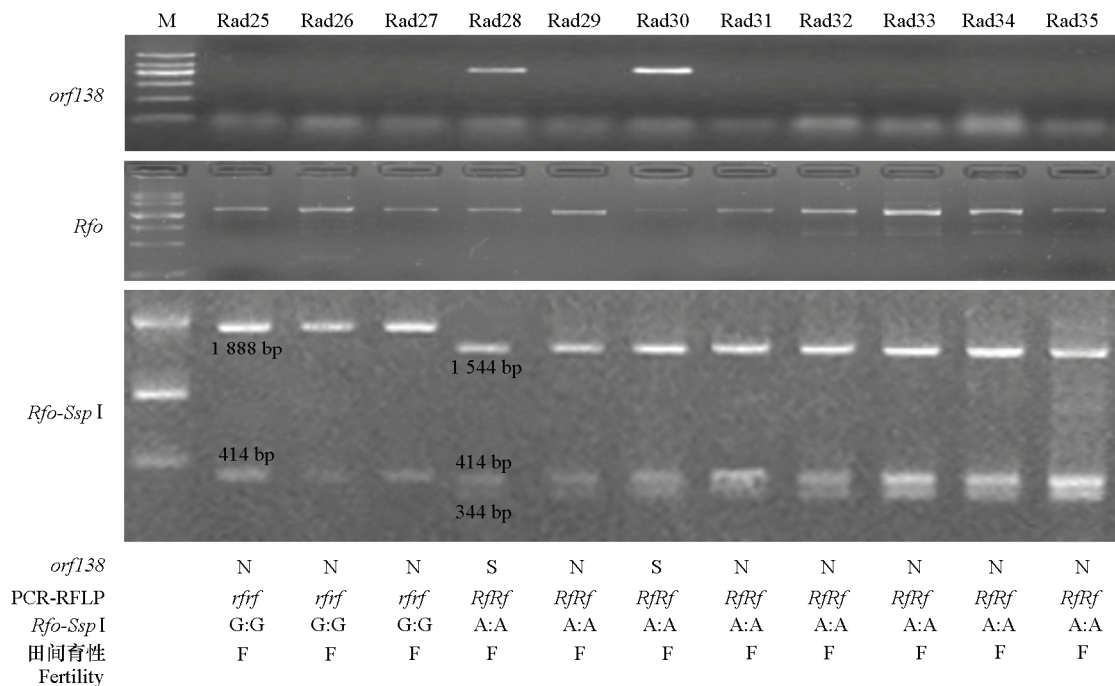


图 3 PCR-RFLP 和 KASP 分子标记对 11 份亲本材料的育性鉴定结果

M: Marker; N: 正常胞质; S: 不育胞质; F: 可育。 *Rfo-SNP1* 标记结果来源于图 2 的 KASP 分型结果。

Fig. 3 The identification of fertility in 11 radish parent lines by the PCR-RFLP and KASP markers

M: Marker; N: Normal cytoplasm; S: Sterile cytoplasm; F: Fertility. The genotype of the *Rfo-SNP1* derived from the results of KASP genotyping in Fig. 2.

2.3 利用不育基因 *orf138* 和育性恢复基因 *Rfo-SNP1* 标记鉴定萝卜育种材料

利用不育基因 *orf138* 和育性恢复基因 *Rfo-SNP1* 标记对 24 个萝卜品种 (Rad1 ~ Rad24) 的 304 个单株进行 *Rfo* 基因型检测。结果显示, 不育系献夏 37A (10 株) 能够扩增出不育基因 *orf138*, 其余 294 个单株均未检测到 *orf138*, 表明 23 个可育品种的细胞质均为正常细胞质 (N)。进一步利用 KASP 基因分型技术, 对 304 个单株的 *Rfo-SNP1* 标记进行分型检测, 其中 289 个单株成功获得基因分型, 而羊角青品种的单株均未获得分型, 基因型为 *rfif* 的有 110 株, 占整个群体的 36.18%, 除 Rad1 外其余均可做保持系材料, 基因型为 *RfRf* 和 *Rfif* 的分别为 156 株和 23 株, 占整个群体的 51.32% 和 7.57% (表 2)。其中山东青、缸萝卜、时无、新关、梅凤等 5 个品种的单株全部为保持系, 西星萝卜、小青萝卜等 10 个品种的单株全部为恢复系, 其他 7 个品种细胞核育性基因在单株之间存在分离 (表 2)。

表 2 育性恢复基因 *Rfo* 在不同萝卜材料分布
Table 2 The genotype of the fertility-restoring gene in radish varieties

品种编号 Accession No.	品种或自交系 Cultivar and inbred lines	检测株数 The number of plants	细胞质类型 Type of cytoplasm	育性恢复基因 <i>Rfo</i> 的基因型 Genotype of fertility restorer gene			
				未分型 Unclassified	<i>rfif</i>	<i>RfRf</i>	<i>Rfif</i>
Rad1	献夏 37A Kenga 37A	10	S	0	10	0	0
Rad2	喜诺青 XINUOQING	6	N	0	4	1	1
Rad3	山东青 Shandongqing	15	N	0	15	0	0
Rad4	露头青 Lutouqing	15	N	0	6	6	3
Rad5	缸萝卜 Gangluobo	11	N	0	11	0	0
Rad6	西星 5 号 Xixing 5	14	N	0	0	14	0
Rad7	小青萝卜 Xiaoqingluobo	15	N	0	0	15	0
Rad8	卫青 Weiqing	12	N	0	0	12	0
Rad9	羊角青 Yangjiaoqing	15	N	15	0	0	0
Rad10	翠帅 Cuishuai	11	N	0	0	11	0
Rad11	清脆 50 Qingcui 50	10	N	0	0	10	0
Rad12	翘头青 Qiaotouqing	15	N	0	0	15	0
Rad13	绿玉 Lüyu	15	N	0	0	15	0
Rad14	二年子大根 Ninengo Daikon	15	N	0	0	15	0
Rad15	时无 Tokinashi	15	N	0	15	0	0
Rad16	青宝夏 Qingbaoxia	15	N	0	0	15	0
Rad17	玉观音 Yuguanyin	15	N	0	5	4	6
Rad18	珍珠白雪 Zhenzhu Baixue	15	N	0	7	6	2
Rad19	白玉秋 Baiyuqiu	12	N	0	3	4	5
Rad20	大师 Dashi	11	N	0	5	1	5
Rad21	新关 Niizeki	14	N	0	14	0	0
Rad22	梅风 Umekaze	10	N	0	10	0	0
Rad23	平安早太 Heianhayabuto	9	N	0	5	3	1
Rad24	T1-155	9	N	0	0	9	0
合计 Total		304		15 (4.93%)	110 (36.18%)	156 (51.32%)	23 (7.57%)

N: 正常胞质; S: 不育胞质。

N: Normal cytoplasm; S: Sterile cytoplasm.

2.4 萝卜雄性不育系的转育

结合表 2 的鉴定结果, 以不育系献夏 37A 为母本, 以育性恢复基因 *Rfo* 的基因型为 *rfif* 的单株为父本进行回交, 对 BC₁ 代单株的育性进行田间鉴定。结果表明 (表 3), 除品种 ‘露头青’ 回交后代单株育性出现分离外, 其余材料回交后代均表现不育。进一步通过连续 6 ~ 7 代回交和轮回亲本自交, 即可获得遗传背景一致、稳定遗传的萝卜不育系和相应的保持系。

表 3 不育系 ‘献夏 37A’ 与 12 个品种回交一代的育性表现
Table 3 The fertility of backcross progeny between Kenga 37A and 12 radish varieties

回交父本 Male parent	品种或自交系 Cultivar and inbred lines	总株数 The number of plants	不育株数 Number of sterile plants	可育株数 Number of fertile plants
Rad2	喜诺青 XINUOQING	26	26	0
Rad3	山东青 Shandongqing	21	21	0
Rad4	露头青 Lutouqing	30	15	15
Rad5	缸萝卜 Gangluobo	24	24	0
Rad15	时无 Tokinashi	25	25	0
Rad17	玉观音 Yuguanyin	15	15	0
Rad18	珍珠白雪 Zhenzhu Baixue	17	17	0
Rad19	白玉秋 Baiyuqiu	22	22	0
Rad20	大师 Dashi	19	19	0
Rad21	新关 Niizeki	24	24	0
Rad22	梅风 Umekaze	20	20	0
Rad23	平安早太 Henaihabuto	18	18	0

针对‘露头青’回交后代单株育性分离的情况,利用 PCR-RFLP 标记再一次对其后代单株核育性基因进行鉴定,结果显示 30 个单株的育性恢复基因 *Rfo* 的基因型全部为 *rfif*, 推测可能还有另外的恢复基因起作用。综上所述,利用高通量 KASP 分型技术对萝卜育性恢复基因 *Rfo*-*SNP1* 标记的分型结果是准确的。目前利用该方法已成功转育了 Rad3A/B、Rad15A/B、Rad20A/B、Rad21A/B、Rad22A/B、Rad23A/B 等 6 套萝卜雄性不育系及保持系,并已应用于杂交组合的配制。

3 讨论

3.1 分子辅助选择技术在萝卜雄性不育系快速转育中的应用

传统雄性不育系转育过程繁琐复杂、费时费力,每代进行回交时无法对父本细胞核内育性基因进行选择,必须与不育系配制组合,后代经田间鉴定育性后才能确定其是否是保持系。从本研究结果可以看出,细胞核育性基因为隐性全不育的在回交父本中的分布频率低(36.18%),如果利用传统的方法,需要配制大量回交后代才有可能选择到保持系。前人根据保持系和恢复系中 *Rfo* 的基因序列差异开发了 PCR-RFLP 标记,并用于萝卜雄性不育系的转育(Yasumoto et al., 2008a, 2008b; Sun et al., 2012)。本研究中开发了 *Rfo*-*SNP1* 标记,成功利用 KASP 分型技术对育性恢复基因 *Rfo* 的基因型进行鉴定。该方法具有高通量、灵敏度高、操作简单等优点,其鉴定结果与 PCR-RFLP 标记、田间育性鉴定相一致,可以用于萝卜雄性不育系的辅助选择。

3.2 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 在萝卜中的分布

本试验所测定的 304 个植株中,有 289 株获得基因分型结果,占整个群体的 95.07%;其中育性恢复基因 *Rfo* 基因型为 *RfRf* 和 *Rfif* 的共占 58.89%,基因型为 *rfif* 的占 36.18%。Yasumoto 等(2008a)研究了恢复基因 *orf687* (*Rfo*) 在日本野萝卜群体中的分布频率,88.1%的植株具有 *orf687* 片段。包含 *orf687* 基因的群体包括 3 种类型,即 Yuan hong 类型(*Rfo*)、Ms-Gensuke 类型(*rfo*)和新的恢复基因类型(*Tmk*, Yasumoto et al., 2008b, 2009),它们在日本野生群体中的分布频率分别为 13.3%、65.5%和 9.3%。因此萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 是主要育性恢复基因类型,但 *Rfo* 和 *rfo* 的分布频率在不同研究群体中有所不同。

3.3 萝卜 Ogura-CMS 具有多个恢复基因

研究表明,萝卜 Ogura-CMS 至少有两对独立的显性基因可恢复其育性(何启伟等,1981;张丽等,1999; Bett & Lydiate, 2004)。在本研究中,羊角青品种具有恢复功能但并没有成功获得基因分型,其是否存在 *Rfo* 基因或是其他的恢复基因还需进一步研究,而‘露头青’品种中育性恢复基因的基因型为 *rfif*,但却能够将不育源献夏 37A 恢复育性,则表明可能存在新的育性恢复基因。这一结果与前人研究相同,Wang 等(2008, 2010)在中国萝卜材料 2006H 和 9802H 中发现了 2 个新的育性恢复基因 *Rfob* 和 *Rfoc*,恢保关系上与 *Rfo* 存在差别。这两个基因均为 *Rfo* 的同源基因,*Rfob* 与 *Rfo* 存在两个碱基的替换,而 *Rfoc* 则是 *Rfo* (PPR-B)与 PPR-C 之间的重组产生的。另外 Yasumoto 等(2009)在日本野萝卜 Tomioka 群体中发现新的恢复基因 *Rfi*,该基因也是 *Rfo* 的同源基因,*Rfi* 与 *Rfo* 存在 19 个碱基的替换。综上所述,目前已知的萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因共 4 个,均为 *Rfo* 的同源基因。本研究中‘羊角青’和‘露头青’品种中存在的恢复基因是否为上述育性恢复基因或者为新的恢复基因有待进一步的研究。

References

- Bett K E, Lydiate D J. 2004. Mapping and genetic characterization of loci controlling the restoration of male fertility in Ogura CMS radish. *Molecular Breeding*, 13 (2): 125 - 133.
- Bonhomme S, Buder F, Lancelin D, Small I, Defrance M C, Pelletier Gandrine. 1992. Sequence and transcript analysis of the *Nco2.5* Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* hybrids. *Molecular Genetics and Genomics*, 235 (2): 340 - 348.
- Brown G G, Formanova N, Jin H, Wargachuk R, Dendy C, Pati P, Lafores M, Zhang J, Cheung W Y, Landry B S. 2003. The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant Journal*, 35 (2): 262 - 272.
- Desloire S, Gherbi H, Laloui W, Marhadour S, Clouet V, Cattolico L, Falentin C, Giancola S, Renard M, Budar F, Small I, Caboche M, Delourme R, Bendahmane A. 2003. Identification of the fertility restoration locus *Rfo* in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Reports*, 4 (6): 588 - 594.
- Duroc Y, Gaillard C, Hiard S, Defrance M C, Pelletier G, Budar F. 2005. Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for Ogura cytoplasmic male sterility in Brassicaceae. *Biochimie*, 87 (12): 1089 - 1100.
- Duroc Y, Hiard S, Vrielynck N, Ragu S, Budar F. 2009. The Ogura sterility-inducing protein forms a large complex without interfering with the oxidative phosphorylation components in rape seed mitochondria. *Plant Molecular Biology*, 70 (1): 123 - 137.
- He Qi-wei, Shi Hui-lian, Liu En-qin. 1981. The development of 77-01A CMS in Chinese radish. *Shandong Agricultural Sciences*, (1): 13 - 16. (in Chinese)
- 何启伟, 石惠莲, 刘恩芹. 1981. 萝卜雄性不育系选育研究初报. *山东农业科学*, (1): 13 - 16.
- Ikegaya Y. 1986. Frequent appearance of cytoplasmic male sterile plants in a radish cultivar Kosena. *Japanese Journal of Breeding*, 36: 106 - 107.
- Imai R, Koizuka N, Fujimoto H. 2002. Identification and characterization of a fertility restorer gene, *rfl1*, for Kosena CMS (3): analysis of allelic polymorphism relevant to *rfl1* gene function. *Breeding Research*, 4: 184.
- Koizuka N, Imai R, Fujimoto H, Hayakawa T, Kimura Y, Kohno-Murase J, Sakai T, Kawasaki S, Imamura J. 2003. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant Journal*, 34 (4): 407 - 415.
- Lee Y, Park S, Lim C, Kim H, Lim H, Ahn Y S, Sung S K, Yoon M K, Kim S. 2008. Discovery of a novel cytoplasmic male-sterility and its restorer lines in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 117 (6): 905 - 913.
- Nahm S, Lee H, Lee S, Joo G, Harn C, Yang S, Min B. 2005. Development of a molecular marker specific to a novel CMS line in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (6): 1191 - 1200.
- Nieuwhof M. 1990. Cytoplasmic-genetic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.). Identification of maintainers inheritance of male sterility and effect of environmental factors. *Euphytica*, 47 (2): 171 - 177.
- Ogura H. 1968. 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. *Memoirs of the Faculty of Agriculture Kagoshima University*, 6: 39 - 78.
- Qin X K, Warguchuk R, Arnal N, Gaborieau L, Mireau H, Brown G G. 2014. *In vivo* functional analysis of a nuclear restorer PPR protein. *BMC Plant Biology*, 14 (1): 313: 1 - 12.
- Rachit K S, Eric V W, Hari D U, Vanessa S, Serah S, Kulbushan S, Paul K, Rajeev K V. 2014. Genetic diversity and demographic history of *Cajanus* spp. illustrated from genome-wide SNPs. *PLoS ONE*, 9 (2): e88568.
- Smith M S, Maughan P J. 2015. SNP genotyping using KASPar assays. *Methods in Molecular Biology*, 1245: 243 - 256.
- Sun X J, Liu Y, Wang L J, Zhu X W, Xu L, Gong Y, Jiang L, Wang L, Liu L. 2012. Molecular characterization of the *Rs-Rfl* gene and molecular marker-assisted development of elite radish (*Raphanus sativus* L.) CMS lines with a functional marker for fertility restoration. *Molecular Breeding*, 30 (4): 1727 - 1736.
- Uyttewaal M, Arnal N, Quadrado M, Martin-Canadell A, Vrielynck N, Hiard S, Gherbi H, Bendahmane A, Budar F, Mireau H. 2008. Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility. *Plant Cell*, 20 (12): 3331 - 3345.
- Wang Z W, Zhang Y, Xiang C, Mei S Y, Zhou Y, Chen G P, Wang T. 2008. A new fertility restorer locus linked closely to the *Rfo* locus for

- cytoplasmic male sterility in radish. *Theoretical and Applied Genetics*, 117 (3): 313 - 320.
- Wang Z W, Zhang L J, Chen J, Xiang C, Mei S Y, Zhou Y, Wang T. 2010. A chimeric *Rfo* gene generated by intergenic recombination cosegregates with the fertility restorer phenotype for cytoplasmic male sterility in radish. *Molecular Breeding*, 25 (2): 339 - 349.
- Wen C, Mao A, Dong C, Liu H, Yu S, Guo Y, Weng Y, Xu Y. 2015. Fine genetic mapping of target leaf spot resistance gene *cca-3* in cucumber, *Cucumis sativus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 128 (12): 2495 - 2506.
- Yamagishi H. 1998. Distribution and allelism of restorer genes for Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes. *Genes and Genetic Systems*, 73 (2): 79 - 83.
- Yamagishi H. 2004. Assessment of cytoplasmic polymorphisms by PCR-RFLP of the mitochondrial *orfB* region in wild and cultivated radishes (*Raphanus*). *Plant Breeding*, 123 (123): 141 - 144.
- Yamagishi H, Terchi T. 1994. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae I. The origin and distribution of Ogura male-sterile cytoplasm in Japanese wild radishes (*Raphanus sativus* L.) revealed by PCR-aided assay of their mitochondrial DNAs. *Theoretical and Applied Genetics*, 87 (8): 996 - 1000.
- Yamagishi H, Terchi T. 1996. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae III. Distribution of Ogura male-sterile cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (3): 325 - 332.
- Yamagishi H, Terachi T. 2001. Intra-and inter-specific variations in the mitochondrial gene *orf138* of Ogura-type male-sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *Raphanus raphanistrum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 (5): 725 - 732.
- Yasumoto K, Matsumoto Y, Terachi T, Yamagishi H. 2008a. Restricted distribution of *orf687* as the pollen fertility restorer gene for Ogura male sterility in Japanese wild radish. *Breeding Science*, 58 (2): 177 - 182.
- Yasumoto K, Nagashima T, Umeda T, Yoshimi M, Yamagishi H, Terachi T. 2008b. Genetic and molecular analysis of the restoration of fertility (*Rf*) genes for Ogura male-sterility from Japanese wild radish (*Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroides* Makino). *Euphytica*, 164 (2): 395 - 404.
- Yasumoto K, Terachi T, Yamagishi H. 2009. A novel *Rf* gene controlling fertility restoration of Ogura male sterility by RNA processing of *orf138* found in Japanese wild radish and its STS markers. *Genome*, 52 (6): 495 - 504.
- Zhang Li, Shen Xiang-qun, Zhao Guo-yu. 1999. Inheritance of male sterility in spring summer radish. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (4): 238 - 243. (in Chinese)
- 张 丽, 沈向群, 赵国余. 1999. 春夏萝卜雄性不育性遗传规律的研究. *园艺学报*, 26 (4): 238 - 243.
- Zhang Li, Yasumoto K, Yamagishi H. 2012. Identification of cytoplasmic male sterility in Chinese radish following PCR analysis of mitochondrial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30 (4): 517 - 526.
- Zhang Li-sha, Dong Guo-qing, Zha Sang, Zhuo Ga, Wang De-liang, Gu Fang-hong, Yuan Xing-miao, Zhang Jing, Guo Gang-gang. 2015. EST-SSR and SNP markers based barley malt purity detection. *Acta Agronomica Sinica*, 41 (8): 1147 - 1154. (in Chinese)
- 张利莎, 董国清, 扎 桑, 卓 嘎, 王德良, 谷方红, 袁兴淼, 张 京, 郭刚刚. 2015. 基于 EST-SSR 和 SNP 标记的大麦麦芽纯度检测. *作物学报*, 41 (8): 1147 - 1154.
- Zhi Sheng-hua, Su Tong-bing, Yu Shuan-cang, Zhang Feng-lan, Yu Yang-jun, Zhang De-shuang, Zhao Xiu-yun, Wang Wei-hong, Lu Gui-xiang, Zhu Yue-lin. 2016. Genetic characteristics of A01-located resistant loci to downy mildew in Chinese cabbage by genome-wide association studies. *Plant Physiology Journal*, 52 (5): 693 - 702. (in Chinese)
- 只升华, 苏同兵, 于拴仓, 张凤兰, 余阳俊, 张德双, 赵岫云, 汪维红, 卢桂香, 朱月林. 2016. 利用全基因组关联分析获得白菜 A01 染色体定位的霜霉病抗病位点和相关分子标记开发. *植物生理学报*, 52 (5): 693 - 702.