

Ogura CMS 育性恢复基因 *orf687* 在萝卜中的分布

张 丽*, 王庆彪, 王艳萍

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业农村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: 以 129 个萝卜品种 (包括 5 个栽培种和 4 个野生种) 为试材, 研究了 Ogura CMS 细胞核育性恢复基因 *orf687* (*Rfo*) 的分布。对 *orf687* 基因扩增的结果表明, 除油用萝卜外, *orf687* 目的片段广泛分布于东亚大长萝卜 (83 份, 89.16%)、欧洲小萝卜 (28 份, 85.71%)、黑萝卜 (6 份, 100%)、荚用萝卜 (1 份, 100%) 和野生萝卜 (10 份, 70%) 中。东亚大长萝卜中的红萝卜品种 95.45% 含有 *orf687*, 高于白萝卜和绿萝卜。进一步利用 PCR-RFLP 对 *orf687* 的基因型进行鉴定发现, 没有恢复功能的基因型 (*rfrf*) 在野生萝卜中所占比率最高, 为 57.14%, 其次是东亚大长萝卜 (47.13%) 和欧洲小萝卜 (37.50%)。在东亚大长萝卜中, 红萝卜品种具有 *rfrf* 基因型的比率为 76.19%, 高于白萝卜 (41.67%) 和绿萝卜 (23.53%)。在利用萝卜细胞质雄性不育材料育种的过程中, *rfrf* 基因型的材料没有育性恢复功能, 可作为保持系, 用于雄性不育系的转育。上述结果可为萝卜雄性不育系的选育和利用提供指导。

关键词: 萝卜; Ogura CMS; 育性恢复基因; 分布

中图分类号: S 631.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 05-0864-11

Distribution of *orf687*, a Fertility Restorer Gene for Ogura CMS in Radish

ZHANG Li*, WANG Qingbiao, and WANG Yanping

(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 and Rural Affairs, P. R. China, Beijing Key Laboratory of Vegetable Germplasm Improvement, Beijing 100097, China)

Abstract: The distribution of *orf687* (*Rfo*), a fertility restorer gene of Ogura CMS, was investigated in 129 radish cultivars, including 5 cultivated species and 4 wild species. Our results showed that *orf687* was widely distributed in East Asian big radish (89.16%), European small radish (85.71%), black radish (100%), pod radish (100%) and wild radish (70%). Among East Asian big radish, 95.45% of the red-skinned radish contained *orf687*, which was higher than that of white radish and green radish. In addition, genotype identification of *orf687* by PCR-RFLP showed that the ratio of double recessive genotype (*rfrf*) without restoring ability was the highest in wild radish (57.14%), followed by East Asia big radish (47.13%) and European small radish (37.50%). Moreover, in East Asian big radish, the

收稿日期: 2020-02-04; 修回日期: 2020-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31872099); 北京市科技新星计划项目 (XX2018086)

* E-mail: zhangli@nercv.org

ratio of red-skinned varieties with *rf1f* genotype was 76.19%, higher than that of white radish (41.67%) and green radish (23.53%). The results clarified the *Rfo* genotypes of different radish varieties, and will provide guidance for the breeding and utilization of male sterile lines.

Keywords: radish; Ogura CMS; *Rfo* gene; distribution

雄性不育系和自交不亲和系是萝卜利用杂种优势的两个主要手段。与自交不亲和系相比, 雄性不育系有两个明显的优势, 一是可以提高杂交种的纯度, 二是可以保证育种者的利益。从遗传上来讲, 将雄性不育分为两种类型: 细胞核雄性不育 (Nuclear male sterility, NMS) 和细胞质雄性不育 (Cytoplasmic male sterility, CMS)。由于二者的遗传模式不同, CMS 比 NMS 更有利于杂交种子的生产, 在萝卜上得到广泛应用。目前在世界各地发现了不同类型的萝卜雄性不育细胞质, 如 Ogura、金花薹 48A、UK-1、Kosena、NWB、DCGMS 等 (Ogura, 1968; 何启伟 等, 1981; Ikegaya, 1986a, 1986b; Nahm et al., 2005; Lee et al., 2008)。其中, Ogura CMS 是目前应用最广泛的雄性不育细胞质。从分子水平上来说, Ogura CMS 由线粒体基因 *orf138* 引起 (Grelon et al., 1994; Krishnasamy & Makaroff, 1994), 该不育性可由细胞核恢复基因 (*Rf*) 恢复, 并已在欧洲萝卜 (Nieuwhof, 1990)、中国萝卜 (Yamagishi, 1998; 张丽 等, 1999) 及日本萝卜 (Yamagishi, 1998) 品种中发现了 *Rf* 基因。之后 3 个研究小组均克隆了 Ogura CMS 育性恢复基因 *Rfo* (*orf687*), 该基因编码一种包含 687 个氨基酸的 PPR 蛋白 (Pentatricopeptide repeat proteins) (Brown et al., 2003; Desloire et al., 2003; Koizuka et al., 2003)。基因序列研究表明, 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 (Koizuka et al., 2003), 在 +118 (Asn/Thr) 位置上的氨基酸与育性恢复功能有关 (Imai et al., 2002)。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。

本研究中以来源于 19 个国家的 129 个萝卜品种为试材, 研究了 *orf687* 在萝卜品种中的分布, 并对具有 *orf687* 扩增片段的品系进行 RFLP 分析以鉴定 *orf687* 的基因型, 这一研究结果可为萝卜雄性不育系的快速转育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以 129 个萝卜品种为试材, 包括 5 个栽培种和 4 个野生种, 其中东亚大长萝卜 (*Raphanus sativus* var. *hortensis* Becker) 83 份, 欧洲小萝卜 (*R. sativus* var. *sativus*) 28 份, 黑萝卜 (*R. sativus* var. *niger* Kerner) 6 份, 油料萝卜 (*R. sativus* var. *oleiformis* Metzg) 1 份, 茺用萝卜 (*R. sativus* var. *caudatus* Hooker & Anderson) 1 份; 野生萝卜 10 份, 包括 2 份欧洲野萝卜 (*R. raphanistrum*), 3 份海萝卜 (*R. maritimus*), 1 份陆萝卜 (*R. landra*) 和 4 份东亚野萝卜 (*R. sativus* var. *raphanistroides*)。83 份东亚大长萝卜包括白萝卜品种 43 份, 红萝卜品种 22 份, 绿萝卜品种 18 份。材料来源于北京市农林科学院蔬菜研究中心种质资源库。2016 年 12 月 15 日将材料播种于北京市农林科学院蔬菜研究中心四季青农场温室中, 2017 年 2 月 15 日取嫩叶进行试验。

表1 材料来源、主要农艺性状和 *Rfo* 基因型Table 1 List of plant materials used in this study and their primary agricultural traits, *Rfo* genotype

类型 Type	来源 Origin	材料编号 Accession No.	材料名称 Cultivar name	根形 Root shape	根皮色 Exterior color of root	根肉色 Color of flesh	育性 Fertility	<i>Rfo</i> 基因型 Genotype
东亚大长萝卜 <i>Raphanus sativus</i> var. <i>hortensis</i> Becker (East Asian big long radish)	中国 China	1	四十天 40 days	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		2	晏种 Yanzhong	圆 Round	白 White	白 White	F	<i>Rf/f</i>
		3	二缨子 Eryingzi	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		4	朝鲜白萝卜 White radish from North Korea	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		5	广西马尔 Guangxi Maer	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		6	鹅蛋白 Edanbai	圆 Round	白 White	白 White	F	—
		7	成都热萝卜 Chendu Reluobo	短圆锥形 Short conical	白 White	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		8	满园花萝卜 Manyuanhua	短圆锥形 Short conical	白 White	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		9	黑叶子 Heiyezi	圆 Round	白 White	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		10	春不老 Chunbulao	圆 Round	白 White	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		11	象牙白 Xiangyabai	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		12	短叶 13 Duanye 13	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		13	圆白 Yuanbai	圆 Round	白 White	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		14	夏抗 40 天 Xiakang 40 days	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		15	九斤萝卜 Jiujin Luobo	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		16	泡里红 Paolihong	长锥形 Long conical	红 Red	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		17	水萝卜 Shuiluobo	长锥形 Long conical	粉 Pink	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		18	一点红 Yidianhong	长圆柱 Long cylindrical	红 - 白 Red-white	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		19	满身红 Manshenhong	长圆柱 Long cylindrical	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		20	胭脂红 Yanzhihong	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		21	穿心红 Chuanxin hong	长锥形 Long conical	红 Red	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		22	红丰 2 号 Hongfeng 2	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>Rf/rf</i>
		23	农大红 Nongdahong	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		24	五樱萝卜 Wuying Luobo	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F	<i>r/rf</i>
		25	长红萝卜 Changhong Luobo	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		26	四缨水萝卜 Siying Shuiluobo	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		27	佳露水萝卜 Jialu Shiluobo	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F	—
		28	扬花萝卜 Yanghua Luobo	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		29	冈水萝卜 Gangshui Luobo	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		30	501 水萝卜 501 Shuiluobo	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		31	密云红 Miyunhong	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		32	东升大红袍 Dongsheng Dahongpao	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		33	北京大红袍 Beijing Dahongpao	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		34	房山红 Fangshan hong	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		35	江苏五樱 Jiangsu Wuying	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		36	锦州五金红 Jinzhou Wujinhong	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>r/rf</i>
		37	国光 Guoguang	短圆柱 Short cylindrical	绿 Green	绿 Green	F ^a	<i>r/rf</i>
		38	青园脆 Qingyuancui	短圆柱 Short cylindrical	绿 Green	绿 Green	F	<i>Rf/rf</i>
		39	鸡西青萝卜 Jixi Qingluobo	长圆柱 Long cylindrical	绿 Green	绿 Green	F	—
		40	平凉萝卜 Pingliang Luobo	长圆柱 Long cylindrical	绿 - 白 Green-white	绿 Green	F ^a	<i>r/rf</i>
		41	中卫半春萝卜 Zhongwei Banchunluobo	长圆柱 Long cylindrical	绿 Green	绿 Green	F	<i>Rf/rf</i>
		42	丹东露头青 Dandong Lutouqing	长圆柱 Long cylindrical	绿 - 白 Green-white	绿 Green	F ^a	<i>r/rf</i>
		43	马桩青萝卜 Mazhuang Qingluobo	长圆柱 Long cylindrical	绿 - 白 Green-white	绿 Green	F	<i>Rf/rf</i>
		44	弯弯青 Wanwanqing	长圆柱 Long cylindrical	绿 Green	绿 Green	F	<i>Rf/rf</i>
		45	青头沙罐 Qingtoushaguan	短圆柱 Short cylindrical	绿 - 白 Green-white	绿 Green	F ^a	<i>r/rf</i>
		46	赛梨 Saili	短圆柱 Short cylindrical	绿 Green	绿 Green	F	<i>Rf/rf</i>
		47	喜诺青 Xinuoqing	短圆柱 Short cylindrical	绿 Green	绿 Green	F	<i>Rf/rf</i>
		48	烟青 2 号 Yanqing 2	短圆柱 Short cylindrical	绿 Green	绿 Green	F	<i>Rf/rf</i>
		49	满堂红 Mantanghong	圆 Round	绿 Green	红 Red	F	<i>RfRf</i>
		50	翠绿 Cuilü	短圆柱 Short cylindrical	绿 Green	绿 Green	F	<i>Rf/rf</i>

续表 1

类型 Type	来源 Origin	材料编号 Accession No.	材料名称 Cultivar name	根形 Root shape	根皮色 Exterior color of root	根肉色 Color of flesh	育性 Fertility	Rfo 基因型 Genotype
		51	黄土岗花叶心里美 Huangtugang Xinlimei with lobelets leaf	卵圆 Oval	绿 Green	红 Red	F	<i>RfRf</i>
		52	黄土岗板叶心里美 Huangtugang Xinlimei without lobelets leaf	圆 Round	绿 Green	红 Red	F	<i>RfRf</i>
		53	北太平庄心里美 Beitaipingzhuang Xinlimei	圆 Round	绿 Green	红 Red	F	<i>RfRf</i>
		54	泰安心里美 Taian Xinlimei	短圆柱 Short cylindrical	绿 Green	红 Red	F	<i>RfRf</i>
	日本	55	ヅマリ大根 Dzumali Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	—
		56	时无大根 Tokinash Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		57	三浦大根 Miura Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		58	二年子 Ninengo Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	—
		59	岛大根 Jima Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		60	花知 Nahashi	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		61	耐病干理想 Taiby-Hoshi-Riso	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		62	青宝夏 Qingbaoxia	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		63	夏季 Xiaji	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	—
		64	白玉秋 Baiyuqiu	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		65	富美大根 Fumi Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		66	樱岛大根 Sakurajima Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	—
		67	耐病系时无大根 Taiby Tokinash	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		68	刀城大根 Buredoshiti Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	—
		69	纪洲大根 Kishu Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		70	阿波晚生大根 Abo Late Daikon	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	—
		71	夏富 Natsuritchi	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
	韩国	72	世农春白 Shinong Chunbai	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
	South	73	YR 白夏王 YR Baixiawang	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
	Korea	74	世农 301 Shinong 301	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	S	<i>rfrf</i>
	巴基斯坦	75	Green Neck	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
	Pakistan							
	朝鲜	76	Pyonggan	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
	Democratic People's Republic of Korea							
	泰国	77	Everert	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
	Thailand	78	Naovarat	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		79	Khao Yank	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
	尼泊尔	80	Variety Pyuthane	短圆锥形 Short conical	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
	Nepal	81	Pyuthane	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
	美国	82	Ve. Ideal Nhle	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
	America	83	Ve. Tevao Sring White	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
欧洲小萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>sativus</i> (European small radish)	墨西哥	84	Semilla De	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
	Mexico							
	朝鲜	85	Goung Song	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F	—
	Democratic People's Republic of Korea							
	荷兰	86	红美玉 Hongmeiyu	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
	Holland	87	丰圆 2 号 Fengyuan 2	圆 Round	红 Red	白 White	S	<i>rfrf</i>
		88	Summer Rettich	圆 Round	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
		89	荷兰红星 Holland Hongxing	圆 Round	红 Red	白 White	S	<i>rfrf</i>
		90	Scharo	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		91	赤丸 20 日 Red Ball 20 days	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
	美国	92	四季白丁 Sijibaiding	圆 Round	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>
	America	93	白樱桃 Baiyingtao	圆 Round	白 White	白 White	F	<i>RfRf</i>

续表 1

类型 Type	来源 Origin	材料编号 Accession No.	材料名称 Cultivar name	根形 Root shape	根皮色 Exterior color of root	根肉色 Color of flesh	育性 Fertility	Rfo 基因型 Genotype
		94	红白 20 日 Hongbai 20 days	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>Rfrf</i>
		95	美玉 Meiyu	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
		96	红丁 Hongding	圆 Round	红 Red	白 White	S	—
		97	Red Ball	圆 Round	紫 Purple	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		98	黄丸二十日大根 Yellow Ball 20 days	圆 Round	浅黄 Light-yellow	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		99	Champion	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
		100	Revosa	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
		101	Asmer Flamenco	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
		102	Asmer Tip Top	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
		103	Woods Early Frame	短圆锥形 Short conical	红 Red	白 White	F	—
		104	White Icycle	长圆柱 Long cylindrical	白 White	白 White	F	—
	奥地利 Austria	105	74149 (74167)	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
	俄罗斯 Russia	106	Cherry Radish	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>Rfrf</i>
	法国 France	107	Cherry Belle	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
	罗马尼亚 Romania	108	Rcdo	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>Rfrf</i>
	意大利 Italy	109	罗莎 Rosa	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>Rfrf</i>
	英国 England	110	Gross Packing	圆 Round	红 Red	白 White	F ^a	<i>rfrf</i>
	英国 England	111	Scarlet Globe	圆 Round	红 Red	白 White	F	<i>RfRf</i>
黑萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>niger</i> Kerner (Black radish)	西班牙 Spain	112	美泰黑参 Black Radish	长圆柱 Long cylindrical	黑 Black	白 White	F	<i>RfRf</i>
	西班牙 Spain	113	东方黑根 Orient Black Radish	长圆柱 Long cylindrical	黑 Black	白 White	F	<i>RfRf</i>
	俄罗斯 Russia	114	黑萝卜 Black Radish	长圆柱 Long cylindrical	黑 Black	白 White	F	<i>Rfrf</i>
	俄罗斯 Russia	115	俄罗斯黑长 Russian Black Long	长圆柱 Long cylindrical	黑 Black	白 White	F	<i>RfRf</i>
	俄罗斯 Russia	116	俄罗斯黑圆 Russian Black Round	圆 Round	黑 Black	白 White	F	<i>RfRf</i>
	英国 England	117	Black Spanish Round	长圆柱 Long cylindrical	黑 Black	白 White	F	<i>RfRf</i>
油用萝卜 <i>R.</i> <i>sativus</i> var. <i>oleiformis</i> Metzg (Oilseed radish)	德国 Germany	118	油用萝卜 Oilseed Radish	卵圆 Oval	浅紫 Light-purple		F	—
荚用萝卜 <i>R.</i> <i>sativus</i> var. <i>caudatus</i> Hooker & Anderson (Tail-podded radish)	英国 England	119	Podding Radish				F	<i>RfRf</i>
野生萝卜 Wild radish	罗马尼亚 Romania	120	<i>R. raphanistrum</i>				F	<i>RfRf</i>
	德国 Germany	121	<i>R. raphanistrum</i>				F ^a	<i>rfrf</i>
	德国 Germany	122	<i>R. maritimus</i>				F	—
	德国 Germany	123	<i>R. maritimus</i>				F	—
	德国 Germany	124	<i>R. maritimus</i>				F ^a	<i>rfrf</i>
	德国 Germany	125	<i>R. landra</i>				F	—
	日本 Japan	126	<i>R. sativus</i> var. <i>raphanistroides</i>				F ^a	<i>rfrf</i>
	日本 Japan	127	<i>R. sativus</i> var. <i>raphanistroides</i>				F	<i>RfRf</i>
	日本 Japan	128	<i>R. sativus</i> var. <i>raphanistroides</i>				F ^a	<i>rfrf</i>
	中国 China	129	四川兰花子 Sichuan Lanhuazi				F	<i>RfRf</i>

注: F 表示雄性可育, S 表示雄性不育, ‘—’ 表示该品种中不含有 *orf687* 基因, ^a 表示细胞质可育。Note: F means male fertility, S means male sterility, ‘—’ means without *orf687*, ^a means normal cytoplasm.

1.2 DNA 的提取与 PCR 扩增

以新鲜叶片为试材, 采用德国 QIAGEN 公司生产的 DNA 提取试剂盒, 按操作手册进行总 DNA 的分离。

根据已发表的 Ogura CMS 的育性恢复基因 *orf687* 序列设计引物 (Koizuka et al., 2003; Yasumoto et al., 2008b)。上游引物 P1: 5'-cttcccttcattgatcaagccg-3', 下游引物 P2: 5'-ctcaatcaatcaactggtgaca-3'。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; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 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。

以雄性不育系 'MS-Gensuke' 和恢复系 'Yuan Hong' 为对照。'MS-Gensuke' 的基因型为 *rfrf*, 'Yuan Hong' 的基因型为 *RfRf* (Yasumoto et al., 2008b)。

1.3 RFLP 分析

根据 PCR 扩增结果, 选取具有 *orf687* 条带的扩增产物, 用限制性内切酶 *Ssp* I (TaKaRa, Japan) 进行消化。酶切反应体系为 20 μL , 含有 MilliQ 水 11.5 μL , 10 \times 内切酶缓冲液 0.5 μL , *Ssp* I 酶 (5 U) 1.0 μL 及 PCR 产物 7.0 μL 。反应体系于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化 2 h, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离。

2 结果与分析

2.1 Ogura CMS 育性恢复基因 *orf687* 在萝卜中的分布

利用育性恢复基因 *orf687* 特异引物 P1/P2 对 129 个不同类型的萝卜品种进行 PCR 扩增。结果显示含有 *orf687* 基因的对照品种 'Yuan Hong'、'MS-Gensuke' 和大多数测试品种中均能扩增出 1 条 1 750 bp 的目的条带 (部分测试品种的结果如图 1)。

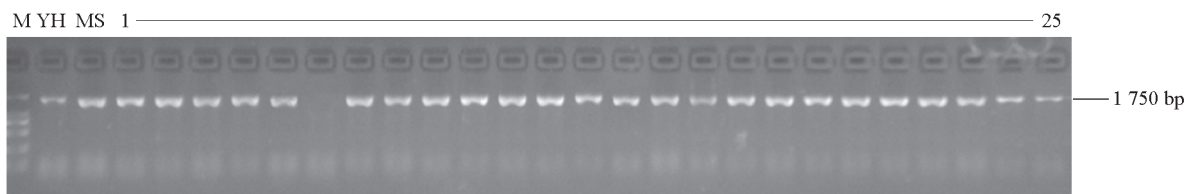


图 1 Ogura CMS 育性恢复基因 *orf687* 在对照品种及待测品种中的扩增谱带

M: Marker 2000; YH: Yuan Hong; MS: MS-Gensuke; 1~25 分别对应表 1 中 1~25。

Fig. 1 Amplification of *orf687* in control and tested radish varieties

M: Marker 2000; YH: Yuan Hong; MS: MS-Gensuke; 1 - 25: 1 - 25 in Table 1.

根据 PCR 扩增结果, 即 1 750 bp 目的片段存在与否, 统计了育性恢复基因 *orf687* 在 129 个萝卜品种中的分布 (表 1, 表 2)。在所检测 129 个品种中, 112 个品种具有 *orf687*, 占总数的 86.82%。其中在东亚大长萝卜 83 个品种 3 种类型平均分布比率为 91.20%, 高于欧洲小萝卜 (85.71%)。所测 6 个黑萝卜和 1 个莱用萝卜均含有该基因, 来源于德国的油用萝卜中没有该基因, 10 个野生萝卜中

有 7 个含有该基因。

在遗传多样性丰富的东亚大长萝卜中，红萝卜中分布频率最高，达到 95.45%，检测的 22 个品种中，仅有 1 个品种不含有该基因；其次是绿萝卜（94.44%）和白萝卜（83.72%）。野生萝卜中，2 个欧洲野萝卜和 4 个东亚野萝卜全部含有 *orf687* 基因，而陆萝卜中没有检测到目的片段；检测的 3 个海萝卜中有 1 个具有 *orf687* 片段。

表 2 育性恢复基因 *orf687* 在不同类型萝卜品种中的分布
Table 2 Distribution of *orf687* in cultivated and wild radishes

亚种 Species	品种类型 Variety type	品种总数 Number of variety	<i>orf687</i> ⁺	所占比率% Ratio of <i>orf687</i> ⁺
东亚大长萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>hortensis</i> Becker (East Asian big long radish)	白萝卜 White skinned 红萝卜 Red skinned 绿萝卜 Green radish	43 22 18	36 21 17	83.72 95.45 94.44
欧洲小萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>sativus</i> (European small radish)		28	24	85.71
黑萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>niger</i> Kerner (Black radish)		6	6	100.00
油用萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>oleiformis</i> Metzg		1	0	0
菜用萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>caudatus</i> Hooker & Anderson (Tail-podded radish)		1	1	100.00
野生萝卜 Wild radish	欧洲野萝卜 <i>R. raphanistrum</i> 海萝卜 <i>R. maritimus</i> 陆萝卜 <i>R. landra</i> 东亚野萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>raphanistroides</i>	2 3 1 4	2 1 0 4	100.00 33.33 0 100.00
合计 Total		129	112	86.82

注: *orf687*⁺表示具有 *orf687* 基因。

Note: *orf687*⁺: Plants with *orf687* gene.

2.2 不同类型萝卜品种中育性恢复基因 *orf687* 的基因型鉴定

根据 *orf687* 在不同材料中的 PCR 扩增结果，对具有 *orf687* 的扩增产物，用限制性内切酶 *Ssp* I 消化，以确定每个品种细胞核育性恢复基因 *orf687* 的基因型。结果显示恢复系 ‘Yuan Hong’（基因型 *RfRf*）获得 1 224 和 526 bp 两条带，不育系 ‘MS-Gensuke’（基因型为 *rfif*）获得 1 条 1 750 bp 条带，而杂合基因型 *Rfif* 获得 1 750、1 224 和 526 bp 的 3 条带（图 2）。

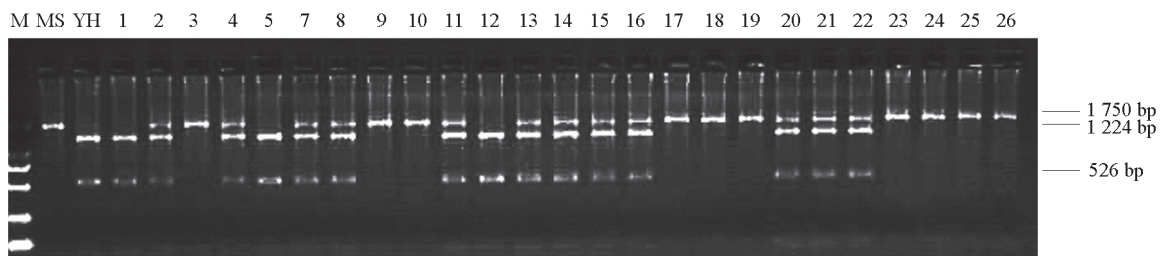


图 2 Ogura CMS 育性恢复基因 *orf687* 在对照及部分品种中的育性基因型

M: Marker 2000; YH: Yuan Hong; MS: MS-Gensuke; 1~26 分别对应表 1 中 1~26。

Fig. 2 Genotypes of *orf687* in the control and different radish varieties

M: Marker 2000; YH: Yuan Hong; MS: MS-Gensuke; Lane 1 - 26: 1 - 26 in Table 1.

根据 PCR-RFLP 结果, 分析不同萝卜材料细胞核育性恢复基因 *orf687* 的基因型 (表 3)。双隐性基因型 (*rfif*) 在东亚大长萝卜中占比较大, 白萝卜为 41.67%, 红萝卜为 76.19%, 绿萝卜为 23.53%, 3 种类型平均为 47.13%; 欧洲小萝卜 (37.50%) 和野生萝卜 (7 种平均 57.14%) 占比也较大。相应的双显性基因型 (*RfRf*) 占比较小, 尤其是在东亚大长萝卜中。1 份茺用萝卜为双显性基因型 *RfRf*, 6 个黑萝卜中有 4 个的基因型为 *RfRf*, 2 个为 *Rfif*。

进一步分析东亚大长萝卜和野生萝卜中的育性恢复基因 *orf687* 的基因型 (表 3), 发现红萝卜品种中 *rfif* 基因型分布频率最高, 达到 76.19%, 且没有检测到 *RfRf* 基因型。绿萝卜 *orf687* 的基因型表现与红萝卜相反, *rfif* 基因型的比率仅为 23.53%, 远远低于红萝卜。2 个欧洲野萝卜的 *orf687* 的基因型分别为 *rfif* 和 *RfRf*。1 份海萝卜的育性基因型为 *rfif*, 东亚野萝卜则包含 3 种基因型。

表 3 不同萝卜材料细胞核中育性恢复基因的基因型
Table 3 Genotypes of *Rfo* gene in cultivated and wild radishes

亚种 Species	品种类型 Variety type	品种总数 Number of variety	育性恢复基因型数 (%) Genotypes of <i>Rf</i> gene (%)		
			<i>rfif</i>	<i>RfRf</i>	<i>Rfif</i>
东亚大长萝卜 <i>Raphanus. sativus</i> var. <i>hortensis</i> Becker (East Asian big long radish)	白萝卜 White skinned	36	15 (41.67)	9 (25.00)	12 (33.33)
	红萝卜 Red skinned	21	16 (76.19)	0 (0)	5 (23.81)
	绿萝卜 Green radish	17	4 (23.53)	5 (29.41)	8 (47.06)
欧洲小萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>sativus</i> (European small radish)		24	9 (37.50)	6 (25.00)	9 (37.50)
黑萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>niger</i> Kerner (Black radish)		6	0 (0)	4 (66.67)	2 (33.33)
茺用萝卜 <i>R. sativus</i> var. <i>caudatus</i> Hooker & Anderson (Tail-podded radish)		1	0 (0)	1 (100)	0 (0)
野生萝卜 Wild radish	欧洲野萝卜 <i>R. raphanistrum</i>	2	1 (50.00)	1 (50.00)	0 (0)
	海萝卜 <i>R. maritimus</i>	1	1 (100.00)	0 (0)	0 (0)
	东亚野萝卜 <i>R. sativus</i>	4	2 (50.00)	1 (25.00)	1 (25.00)
	var. <i>raphanistroides</i>				
总计 Total		112	48 (42.86)	27 (24.11)	37 (33.03)

检测的 5 个心里美品种 100% 为恢复基因型 *RfRf* (表 4)。这一结果表明, 不能利用 Ogura 不育源选育心里美雄性不育系。因此, 有必要发现新的不育源, 以扩大雄性不育系在不同类型品种中的应用。

表 4 ‘心里美’萝卜中细胞核的育性基因型
Table 4 Genotypes of *Rfo* gene in ‘Xinlimei’ radish

品种名称 Variety name	检测株数 Number of plants	育性恢复基因型数 Genotypes of <i>Rfo</i> gene		
		<i>rfif</i>	<i>RfRf</i>	<i>Rfif</i>
黄土岗花叶心里美 Huangtugang Xinlimei with lobelets leaf	8	0	8	0
黄土岗板叶心里美 Huangtugang Xinlimei without lobelets leaf	15	0	15	0
北太平庄心里美 Beitaipingzhuang Xinlimei	6	0	6	0
泰安心里美 Taian Xilimei	7	0	7	0
满堂红 Mantanghong	11	0	11	0
合计 Total	47	0	47	0

Ogura CMS 的恢复基因广泛分布于日本野生萝卜中, 大多数日本栽培萝卜中没有恢复基因 (Yamagishi & Terachi, 1994)。对来源于中国和日本的东亚大长萝卜、欧洲小萝卜 3 大栽培类型的育性恢复基因型进行检测, 发现不育基因型占主导, 而恢复基因型所占比较小 (表 5)。这一结果进一步证实了无论是日本栽培萝卜, 还是中国及欧洲栽培萝卜中大多数没有育性恢复基因 (Yamagishi, 1998)。

表 5 来源于不同区域栽培萝卜的育性恢复基因型
Table 5 Genotypes of *Rfo* gene in radish varieties from different regions

品种来源 Origin	品种数 Number of variety	<i>orf687</i> 品种数 Number of variety with <i>orf687</i>	育性恢复基因型数 (%) Genotypes of <i>Rfo</i> gene (%)		
			<i>rfif</i>	<i>RfRf</i>	<i>Rfif</i>
中国 China	54	51	23 (45.10)	8 (15.69)	20 (39.22)
日本 Japan	17	11	7 (63.64)	2 (18.18)	2 (18.18)
欧洲 Europe	28	25	11 (44.00)	6 (24.00)	8 (32.00)

3 讨论

本试验中检测了萝卜雄性育性恢复基因 *orf687* 在 5 个栽培种及 4 个野生种中的分布, 除油用萝卜外, 几乎所有萝卜种中均含有 *orf687* 基因, 占有检测群体 86.82%, 在东亚大长萝卜中的红萝卜类型中, 分布比率高达 95.45%。所检测的 10 份野生种材料中有 7 个具有 *orf687* 基因, 这说明 *orf687* 广泛分布于萝卜栽培种和野生种中。Yasumoto 等 (2008b) 研究了恢复基因 *orf687* 在日本野萝卜群体中的分布频率, 88.1% 的植株具有 *orf687* 片段, 本研究结果与其一致。另外, *orf687* 在不同萝卜品种中分布呈现不均衡性, 以东亚大长萝卜为例, 在红萝卜中分布最高, 而在白萝卜中分布最低。进一步对 *orf687* 的基因型进行测定, 没有育性恢复功能的基因型 *rfif* 在东亚大长萝卜、欧洲小萝卜、及野萝卜中均有分布, 而在黑萝卜及莱用萝卜中则不存在。在 3 个类型东亚大长萝卜中, *rfif* 基因型在红萝卜中的比率最高, 在绿萝卜中最低。在心里美类型萝卜中没有找到 *rfif* 基因型, 说明该类型材料不适合利用 Ogura-CMS 获得雄性不育系。萝卜生育周期长, 选育遗传稳定的雄性不育系需要 7—8 年。为了找到合适的保持系, 需要试配大量的杂交组合, 并在田间进行育性鉴定。利用分子标记明确不同类型萝卜育性基因型, 可以实现在苗期鉴定育性, 节省大量时间及人力。对于细胞核内不含有雄性不育基因型的育种材料, 可以采用人工合成保持系或利用新的不育源来选育雄性不育系。

王庆彪等 (2017) 对 23 个栽培萝卜品种的细胞质不育基因 *orf138* 和细胞核育性恢复基因 *Rfo* 的基因型进行鉴定, 主要目的是在前人研究的基础上 (Yasumoto et al., 2008a) 开发用于辅助选择的高通量 SNP 标记并应用于保持系材料的筛选, 除此之外还初步发现育性恢复基因在不同栽培类型中的分布频率存在差异, 但是由于试验材料较少, 没有明显的规律。Yasumoto 等 (2008a) 发现 *Rfo*、*rfo* 和新的恢复基因 (*Rfi*) 3 种类型在不同来源萝卜野生群体中的分布频率存在差异, 但并未涉及其他野生萝卜亚种和栽培萝卜 (Yasumoto et al., 2008b, 2009)。本研究中利用多个生态类型的萝卜品种研究雄性不育育性恢复基因 *Rfo* 的分布, 对 Ogura-CMS 在每种栽培类型萝卜的中应用潜力有了整体了解, 从而可针对不同的栽培类型选择合适的不育源或者不同的转育方式。

研究表明, 萝卜 Ogura-CMS 至少有两对独立的显性基因恢复其育性 (何启伟 等, 1981; 张丽 等, 1999; Bett & Lydiate, 2004)。目前已知的位点包括 *Rfo/Rfk1* (Brown et al., 2003; Desloire et al., 2003; Koizuka et al., 2003) 和 *Rf3* (Wang et al., 2013, 2015, 2017)。在本研究中, 有些品种没有扩增出 *orf687*, 是否存在 *Rf3* 位点恢复基因, 将在接下来的研究中进一步鉴定。另外, 在 *Rfo* 位点, 等位基因变异也很丰富, 除了本研究中检测的 *Rfo/rfo* 等位基因外 (Yasumoto et al., 2009), 在少量材料中还存在一些其他等位基因, 如 *Rfob* (Wang et al., 2008), *Rfoc* (Wang et al., 2010), *Rfi* (Yasumoto et al., 2008a, 2009), *PPR-B-31* (Hawliczek-Strulak et al., 2015), *rfo¹⁵²/rfo⁸¹* (Kim et al., 2009) 和 *L7rfo/D81Rfo* (Hernandez et al., 2010)。因此, 有必要对每个品种的育性基因型进行更加详细的鉴定, 为雄性不育系的转育提供指导。

References

- Bett K E, Lydiat 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.
- 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.
- Grelon M, Budar F, Bonhomme S, Pelletier G. 1994. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS) -associated *orf138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* hybrids. *Mol Gen Genet*, 243: 540 - 547.
- Hawliczek-Strulak A, Bartoszewski G, Slomnicka R, Korzeniewska A, Delourme R, Bartkowiak-Broda T, Niemirowicz-Szczytt K. 2015. PPR-B-31: a new maintainer allele in the male-fertility restorer gene of radish (*Raphanus sativus*) Ogura cytoplasm. *Plant Breeding*, 134: 557 - 563.
- 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.
- Hernandez Mora J R, Rivals E, Mireau H, Budar F. 2010. Sequence analysis of two alleles reveals that intra-and intergenic recombination played a role in the evolution of the radish fertility restorer (*Rfo*). *BMC Plant Biol*, 10: 35.
- Ikegaya Y. 1986a. Practical cytoplasmic male sterile line "UK-1" obtained from Chinese radish. *Jpn J Breed*, 36 (Suppl 1): 104 - 105.
- Ikegaya Y. 1986b. Frequent appearance of cytoplasmic male sterile plants in a radish cultivar Kosena. *Jpn J Breed*, 36 (Suppl 2): 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. *Breed Res*, (4): 184.
- Kim S, Lim H, Cho K H, Park P H, Park S, Sung S K, Oh D, Kim K T. 2009. Development of gene-based markers for the allelic selection of the restorer-of fertility gene, *Rfo*, in radish (*Raphanus sativus*). *Korean J Breed Sci*, 41 (3): 194 - 204.
- 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 J*, (34): 407 - 415.
- Krishnasamy S, Makaroff C A. 1994. Ogura-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. *Plant Mol Biol*, 26: 935 - 946.
- 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.). *Theor Appl Genet*, 117: 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.). *Theor Appl Genet*, 111: 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): 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. *Mem Fac Agric Kagoshima Univ*, 6: 39 - 78.
- Wang Qing-biao, Zhang Li, Wen Chang-long, Yang Jing-jing. 2017. Development and application of high-throughput SNP markers for Ogura-CMS fertility restorer gene in radish. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (7): 1309 - 1318. (in Chinese)
- 王庆彪, 张 丽, 温常龙, 杨静静. 2017. 萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 的高通量 SNP 标记开发及其应用. *园艺学报*, 44 (7): 1309 - 1318.
- Wang Z W, Wang C D, Cai Q Z, Mei S Y, Gao L, Zhou Y, Wang T. 2017. Identification of promoter exchange at a male fertility restorer locus for cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.). *Molecular Breeding*, 37: 82.
- Wang Z W, Wang C D, Gao L, Mei S Y, Zhou Y, Xiang C P, Wang T. 2013. Heterozygous alleles restore male fertility to cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus* L.): a case of over dominance. *J Exp Bot*, 64: 2041 - 2048.

- Wang Z W, Wang C D, Mei S Y, Gao L, Zhou Y, Wang T. 2015. An insertion-deletion at a pentatricopeptide repeat locus linked to fertility transition to cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.). *Molecular Breeding*, 35: 108.
- 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.
- 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.
- Yamagishi H. 1998. Distribution and allelism of restorer genes for Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes. *Genes Genet Syst*, (73): 79 - 83.
- 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. *Theor Appl Genet*, 87: 996 - 1000.
- 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 a 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.