

两个洋葱雄性不育系细胞质类型的鉴定与分析

吴海涛^{1,3}, 王建军², 侯喜林^{1,2*}, 刘洪炯³, 马蓉莉³, 马景蕃²

(¹南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; ²农业部南方蔬菜遗传改良重点开放实验室, 南京 210095; ³山西省农业科学院蔬菜研究所, 太原 030031)

摘要: 采用分子生物学手段, 对从国内品种中选育出的两套洋葱细胞质雄性不育系进行了细胞质类型的鉴定, 并用 189 个 RAPD 引物分析了不育系和相应保持系之间的多态性。结果表明, 来自品种 ‘沙沟红皮’ 的不育系为 T 型细胞质类型, 从 ‘朔州紫皮’ 中选育出的不育系为 S 型细胞质。对这两套近等位基因系的基因组随机扩增结果显示, 与 T 雄性不育系相比, S 型不育系与其保持系基因组之间有更多的差异。

关键词: 洋葱; 细胞质雄性不育系; 鉴定; 多态性

中图分类号: S 633.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 05-0723-04

Identification and Analysis of Cytoplasmic Male Sterility in Onion (*Allium cepa* L.) Origin from Chinese Cultivars

WU Hai-tao^{1,3}, WANG Jian-jun², HOU Xi-lin^{1,2*}, LU Hong-jiong³, MA Rong-li³, and MA Jing-fan²

(¹State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China; ³Vegetable Institute of Agriculture Academy of Sciences in Shanxi, Taiyuan 030031, China)

Abstract: In this paper, two sets of cytoplasmic male sterile lines, came from two different onion cultivars (*Allium cepa* L.), were investigated by molecular method, and were discussed about their polymorphisms with corresponding maintainers. The results showed that the cytoplasm of male sterile lines origin from ‘Shagou Hongpi’ and ‘Shuozhou Zipi’ are T and S, respectively. RAPD amplification showed that the S cytoplasm has more polymorphism than T cytoplasm compared to their maintainer lines.

Key words: onion; cytoplasmic male sterile line; identification; polymorphism

植物细胞质雄性不育性状是由细胞质基因发生突变引起的, 细胞核通过特定基因在转录或翻译水平对突变基因产物进行修复, 使其恢复育性 (Patrick & Roger, 1998)。在洋葱 (*Allium cepa* L.) 中, 与细胞质雄性不育密切相关的细胞质基因变异被用来区别雄性不育遗传表现类型, 由这些变异发展而来的分子标记已应用于雄性不育类型的区分以及在苗期从未知群体中筛选不育株。cob 基因变异是在 Northern 杂交基础上通过建立线粒体基因组文库, 克隆并测序后发现的。与保持系相比, 洋葱 S 型雄性不育线粒体 cob 基因上游区域有一个 471 bp 片段的插入, 用这个标记可以方便地从群体中找出含有 S 型不育细胞质的植株 (Sato, 1998)。但用该标记不能区别 T 型细胞质和正常可育细胞质。Engelke 等 (2003) 发现与细香葱 CMS1 相关的特殊阅读框 (orfA501) 在洋葱 S 型和 T 型细胞质中都存在, 但细胞质正常的可育系中没有。二者相结合即可以从分子水平将 S 型、T 型不育系和可育系区分开。

S 型不育可以由一对隐性细胞核基因 (*mms*) 恢复, 杂交后代按 3:1 分离, 遵循经典的孟德尔遗传规律 (Jones & Clarke, 1943), 在 ‘Italian Red’ 品种中被发现的不育株 (Jones & Emmsweller,

收稿日期: 2008 - 11 - 04; 修回日期: 2009 - 03 - 24

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE2008311)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hxl@njau.edu.cn)

1936) 就是这种类型; T型不育系是由 Beminger (1965) 在法国品种 ‘Jaune paille des venus’ 中发现的, 它受一对独立的 (*aa*) 和两对互补的 (*bicc*) 细胞核基因共同控制, 杂交后代分离比较复杂 (Schweigsuth, 1973)。另一种比较特殊的遗传表现类型是从印度当地品种 ‘Nasik White Globe’ 中发现的, 是一种由细胞质控制的显性雄性不育, 该雄性不育系与 350个其它洋葱品种的杂交后代都表现雄性不育 (Pathak & Gowda, 1993), 从分子水平分析认为它属于 S型细胞质 (Havey, 2000)。

国内洋葱细胞质雄性不育系的选育比较滞后, 对来源于国内地方品种的雄性不育系细胞质的鉴定还未见报道。作者对从 ‘沙沟红皮’ 和 ‘朔州紫皮’ 中选育出的洋葱雄性不育系进行了细胞质类型鉴定, 并分析了它们与相应保持系的多态性, 为洋葱杂交品种的选育提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料均由山西省农业科学院蔬菜研究所刘洪炯研究员提供。细胞质雄性不育系 8A 和保持系 8B, 从 ‘沙沟红皮’ 中选出, 回交 9代; 细胞质雄性不育系 11A 和保持系 11B, 从 ‘朔州紫皮’ 中选出, 回交 8代。两套不育系和保持系都是近等位基因系。4个品系的种子于 2007年 10月 2日播种于南京农业大学试验区大棚中, 用草炭作基质育苗。Taq酶和 dNTP购自 TAKARA 公司; 引物由金斯特公司合成; PCR反应在 Eppendorf公司生产的 Mastercycler Gradient PCR 仪 (型号 5345) 上进行。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 2008年 2月 10日从 4个月大小的幼苗中取 5株, 共采 0.5 g叶片混合, 用改良的 CTAB 法 (Bradeen & Havey, 1995) 提取基因组 DNA。提取的 DNA 在 1.0%琼脂糖凝胶上电泳, 以 Marker 2000为对照进行检测并估计其浓度。

1.2.2 细胞质类型鉴定 区别洋葱不同细胞质类型需参考 *cob* (Sato, 1998) 和 *orfA501* (Engelke et al, 2003) 两个分子标记的扩增产物。*cob*基因标记引物有 3条: *cob* (S) GTCCAGTTCCTATAGAACCCTACT; *cob* (N) TCTAGA TGICGATCA GTGGAA TCC; *cob* (C) CTTTICTA TGGTGACA ACTCCTCTT。*orfA501* 阅读框的引物为: F: ATGGCTCGCCTTGAAA GAGAGC 和 R: CCAAGCATTTGGCGCTGAC。

PCR 扩增采用 20 μ L 体系, 混合液中包含总 DNA 50 ng, 各引物 0.25 μ mol \cdot L⁻¹、dNTP 0.15 mmol \cdot L⁻¹、Mg²⁺ 0.2 mmol \cdot L⁻¹、1 \times Buffer 和 Taq 聚合酶 1 U。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 53 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物以 1.5%琼脂糖凝胶为介质, 在 1 \times TAE 缓冲液中电泳, EB 显色, 培清 JS-300凝胶图像分析系统中拍照。

1.2.3 RAPD 扩增 用 189个 RAPD 引物对基因组 DNA 进行扩增, 扩增程序参考陈沁滨等 (2006), 稍修改。20 μ L 反应体系中包含 1 \times Buffer, 2.0 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺、Taq 1 U、200 μ mol \cdot L⁻¹ dNTP、0.6 μ mol \cdot L⁻¹ 随机引物和 15 ng DNA 模板; PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 35 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延长 1.5 min, 40个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后, 在培清 JS-300凝胶图像分析系统中拍照, 统计有差异条带的引物。

2 结果与分析

2.1 细胞质雄性不育类型

如图 1所示, 两个细胞质雄性不育系类型的扩增结果与 Sato (1998) 和 Engelke 等 (2003) 报道的扩增片段大小相同。采用 *cob* 标记引物在可育系和 T型不育系之间扩增的条带相同, 414 bp 大小的条带很弱, 180 bp 大小的条带很亮, 而在 S型不育系中与之相反, 414 bp 大小的条带很亮, 180 bp 大小的条带很弱; 用 *orfA501* 标记引物只能在不育系中扩增出 473 bp 大小的条带, 而可育系中没有或者很弱。由图 1可以看出, *cob* 标记在 11A 以及它组配的 F₁ 基因组中扩增到的两个条带 (414 bp 和

180 bp) 与保持系 (8B、11B)、不育系 8A 和以 8A 为母本组配的 F_1 的条带正好相反, 11A 中 414 bp 的条带很亮, 180 bp 的条带亮度很弱, 说明从 ‘朔州紫皮’ 中选育出的不育系 11A 属于 S 型细胞质不育。而不育系 8A 与它的保持系 8B 以及 F_1 扩增结果相同, 无法区分。再根据对 *orfA501* 的扩增结果 (图 1) 可以看出从 8A 中扩增到了 473 bp 的片段, 而且亮度与 11A 相当, 证明为雄性不育系, 因此可以确定源自 ‘沙沟红皮’ 的雄性不育系 8A 属于 T 型细胞质不育。对于基因 *cob* 和 *orfA501* 的扩增结果, 不育系和其杂交一代总是相同的, 从而证明试验所用引物的靶基因在细胞质中 (图 1)。

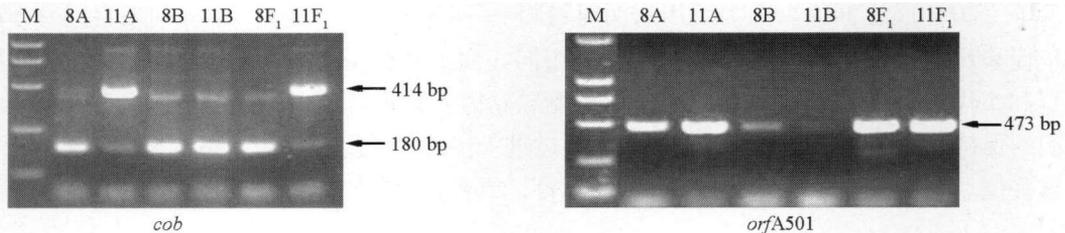


图 1 线粒体 *cob* 和 *orfA501* 标记扩增结果

A: 不育系; B: 保持系; F_1 : 杂交一代; 8: ‘沙沟红皮’; 11: ‘朔州紫皮’; M: 分子大小标记。

Fig. 1 Amplifications of the *cob* and *orfA501* marker

A: Sterility; B: Maintainer; F_1 : Hybrid generation; 8: ‘Shagou Hongpi’; 11: ‘Shuozhou Zipi’; M: Molecular marker

2.2 基因组 RAPD 扩增

采用 189 个 RAPD 引物对两个雄性不育系和相应保持系的基因组 DNA 进行了扩增。在不育系 8A 和保持系 8B 之间扩增出差异常条带的有 2 个引物 (AS15 和 RY1); 而在不育系 11A 和保持系 11B 之间有 5 个引物 (AM2、AO4、AO12、RY12、RY13) 扩增出差异常条带 (图 2)。其条带差异的表现为有和没有的差异 (如 AS15、AO4 和 AO12), 说明此处有一个插入或者缺失的突变; 也有条带亮度强弱的差异如 RY1、AM2、RY12 和 RY13, 这是由目的基因的重复数不同或错配造成的。从 RAPD 扩增结果来看, T 型不育系和保持系之间多态性较低, 而 S 型不育系和保持系之间多态性高。这个结果与 Holford 等 (1991) 和 Havey (2000) 的研究结果一致, 进一步证明了 T 型不育与栽培种基因组差异较小, 而 S 型不育与栽培种的基因组差异较大。

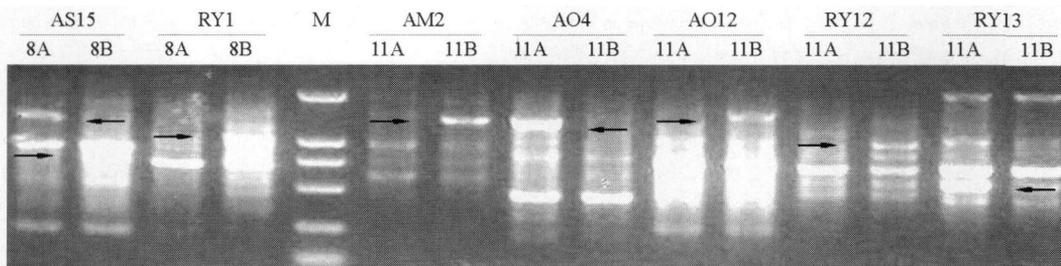


图 2 两套近等位基因系基因组的随机扩增条带差异

A: 不育系; B: 保持系; 8: ‘沙沟红皮’; 11: ‘朔州紫皮’; M: 分子大小标记。

Fig. 2 Diversity of RAPD amplifications in two set of onion near isogenic lines (NL)

A: Sterility; B: Maintainer; 8: ‘Shagou Hongpi’; 11: ‘Shuozhou Hongpi’;

M: Molecular marker

3 讨论

洋葱不同类型的细胞质雄性不育系可能会有不同的丰产潜力, 与不同来源品种的配合力也可能有差异, 而且如果单一细胞质类型的杂交品种大面积栽培, 可能会发生大规模病虫害。因此洋葱雄性不

育细胞质鉴定有重要意义。*cob*和 *orfA501* 两个分子标记是以国外品种为基础材料的研究成果, 本试验的结果表明它们也应用于中国当地品种的细胞质鉴定, 但两个试验材料之间的关系令人怀疑, 因为线粒体基因进化速度比较快 (David, 2007), 而很多线粒体重组都可以导致植物雄性不育 (Patrick & Roger, 1998; Renate, 2006)。另外采用特殊引物扩增时, 有的品系中条带非常弱, Engelke 等 (2003) 认为靶基因可能是以 Sublimon 的形式存在。本试验中扩增出差异常条带的随机引物数量占所用随机引物总数的比例 (1%和 2.5%) 远低于李园园等 (2006) 的 5%和刘杰等 (2004) 的 12%以及陈沁滨等 (2007) 的 34%。因为所用的两对材料——8A/8B 和 11A/11B, 分别来自同一个品种, 且经过 9代和 8代的回交, 其细胞核基因几乎相同。而上述研究者所用材料经过 4代 (陈沁滨等, 2007) 和 5代 (李园园等, 2006) 回交, 细胞核基因差异相对较大。虽然在两个类型的雄性不育系和它们的保持系中扩增出了差异条带, 但是经过进一步的验证发现它们并不能作为分子标记。可能是因为这些位点的变异不足以造成细胞质雄性不育, 或者因为不同不育系不育机理有差异。

References

- Beminger 1965. Contribution a l'étude de la sterilité-male de l'oignon (*Allium cepa* L.). Ann Amélior Plant, 15: 183 - 199.
- Bradeen J M, Havey M J. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA in bulb onion and its use to assess inbred integrity. J Am Soc Hortic Sci, 120: 752 - 758.
- Chen Qin-bin, Hou Xi-lin, Wang Jian-jun, Leng Yue-qiang, Jiang Fang-ling, Xue Ping 2006. Optimization of RAPD-PCR reaction system for onion (*Allium cepa* L.) by orthogonal design. Jiangsu J of Agr Sci, 22 (4): 434 - 438. (in Chinese)
- 陈沁滨, 侯喜林, 王建军, 冷月强, 蒋芳玲, 薛萍. 2006. 洋葱 (*Allium cepa* L.) RAPD-PCR反应体系及扩增程序的优化. 江苏农业学报, 22 (4): 434 - 438.
- Chen Qin-bin, Hou Xi-lin, Chen Xiao-feng, Zhang Jing-yi, Xue Ping 2007. Identification of RAPD and SCAR markers linked to the cytoplasmic male sterility of onion line. Journal of Nanjing Agricultural University, 30 (4): 16 - 19. (in Chinese)
- 陈沁滨, 侯喜林, 陈晓峰, 张静宜, 薛萍. 2007. 洋葱细胞质雄性不育基因 RAPD 及 SCAR 分子标记研究. 南京农业大学学报, 30 (4): 16 - 19.
- David D. 2007. Molecular biology. Beijing: Science Press: 559.
- Engelke T, Terefe D, Tatlioglu T. 2003. A PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). Theor Appl Genet, 107: 162 - 167.
- Havey M J. 2000. Diversity among male-sterility-inducing and male-sterile cytoplasm of onion. Theor Appl Genet, 101: 778 - 782.
- Holford P, Croft J, Newbury H J. 1991. Differences between and possible origins of the cytoplasm found in fertile and male-sterile onions (*Allium cepa* L.). Theor Appl Genet, 82: 737 - 744.
- Li Yuan-yuan, Wang Zhong, Liang Feng, Shen Li-zhen, Yan Ji-yong, Yang Qing 2006. RAPD analysis of the genomic DNA of CMS line 70 and its maintainer line 71 in onion. Biotechnology Bulletin, 6: 100 - 102. (in Chinese)
- 李园园, 王忠, 梁峰, 沈丽珍, 严继勇, 杨清. 2006. 洋葱细胞质雄性不育系 70 及其保持系 71 基因组 DNA 的 RAPD 分析. 生物技术通报, 6: 100 - 102.
- Liu Jie, Cui Cheng-ri, Cui Chong-shi, Li Jing-peng 2004. RAPD analysis of mitochondrial DNA of CMS line and its maintainer in onion. Journal of Northeast Agricultural University, 35 (3): 322 - 324. (in Chinese)
- 刘杰, 崔成日, 崔崇士, 李景鹏. 2004. 洋葱细胞质雄性不育系与相应保持系线粒体 DNA 的 RAPD 扩增. 东北农业大学学报, 35 (3): 322 - 324.
- Jones H, Emsweller S. 1936. A male sterile onion. Proc Am Sc, 34: 582 - 585.
- Jones H, Clarke A. 1943. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. Proc Am Soc Hortic Sci, 43: 189 - 194.
- Pathak C, Gowda R. 1993. Breeding for the development of onion hybrids in India: Problems and prospects. Acta Hort, 358: 239 - 242.
- Patrick S, Roger P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends in Plant Science, 3 (5): 175 - 181.
- Renate H. 2006. Recombination: Cytoplasmic male sterility and fertility restoration in higher plants. Progress in Botany, 67: 31 - 53.
- Sath Y. 1998. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). Theor Appl Genet, 96: 367 - 370.
- Schweigsuth B. 1973. Etude d'un nouveau type de sterilité male chez l'oignon, *Allium cepa* L. Ann Amélior Plant, 23: 221 - 233.