

翟利佳, 杨馥睿, 刘自刚, 等. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育的细胞学观察及不育胞质类型鉴定[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(1): 21-27.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.01.003

# 甘蓝型油菜细胞质雄性不育的细胞学观察及不育胞质类型鉴定

翟利佳, 杨馥睿, 刘自刚, 魏家萍, 崔俊美, 武泽峰, 方彦

(甘肃农业大学农学院/省部共建干旱生境作物学国家重点实验室/甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 为明确 22N317A、22N195R<sub>2</sub>A 和 22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 3 个细胞质雄性不育(CMS)系甘蓝型冬油菜花粉败育机理及不育胞质类型,本研究以 3 组甘蓝型冬油菜细胞质雄性不育系及保持系为材料,通过观察花器形态和细胞特征,并根据油菜育性相关基因 *orf138*、*orf222*、*orf224* 设计引物对 3 份甘蓝型冬油菜不育胞质类型进行多重 PCR 分子鉴定。结果表明:3 个不育材料花瓣平展、花药不可正常散粉、花丝短小、柱头较长。不育系花粉的发育受阻于四分体至单核小孢子期间;不育系常规压片细胞学观察结果显示四分体之后未观察到小孢子或者花粉粒;不育系石蜡切片显微镜观察显示花粉四分体时期绒毡层异常膨大,挤压药室里的四分体,使药室变形,最终导致雄性不育。3 个不育系的不育胞质类型均是 Ogu NWSUAF CMS。

**关键词:** 甘蓝型油菜; 细胞质雄性不育; 花器形态; 细胞学观察; 育性鉴定

**中图分类号:** Q343.3<sup>+</sup>4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)01-0021-07

## Cytological observation and sterile cytoplasm type identification of cytoplasmic male sterile *Brassica napus* L.

ZHAI Lijia, YANG Furui, LIU Zigang, WEI Jiaping, CUI Junmei, WU Zefeng, FANG Yan

(Agronomy College, Gansu Agricultural University/State Key Laboratory of Aridland Crop Science/Gansu Key Lab of Crop Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In order to clarify the pollen abortion mechanism and sterile cytoplasm type of 22N317A, 22N195R<sub>2</sub>A and 22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A cytoplasmic male sterile (CMS) lines of winter oilseed rape, three cytoplasmic male sterile lines and maintainer lines of winter oilseed rape were used as materials in this study. The flower morphology and cell characteristics were observed, and primers were designed according to the fertility-related genes *orf138*, *orf222* and *orf224* of oilseed rape for multiplex PCR molecular identification. The results showed that the petals of the three sterile materials were flat, the anthers could not disperse pollen normally, the filaments were short and the stigmas were long. The development of pollens of sterile lines was blocked during the period from tetrad to mononuclear microspore. The results of conventional cytological observation of sterile lines showed that no microspores or pollen grains were observed after the tetrad. Paraffin sections of the sterile line showed that the tapetum expanded abnormally during the pollen tetrad period, squeezing the tetrad in the anther chamber, causing the anther chamber to deform and eventually leading to male sterility. The sterile cytoplasm type of the three sterile lines was Ogu NWSUAF CMS.

收稿日期: 2024-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860388), 甘肃省科技重大专项(22ZD6NA009), 甘肃省科技计划项目(23CXJA0001)

作者简介: 翟利佳(1998-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为作物遗传育种。(E-mail)2779659163@qq.com

通讯作者: 方彦, (E-mail)ffyv@163.com

Paraffin sections of the sterile line showed that the tapetum expanded abnormally during the pollen tetrad period, squeezing the tetrad in the anther chamber, causing the anther chamber to deform and eventually leading to male sterility. The sterile cytoplasm type of the three sterile lines was Ogu NWSUAF CMS.

**Key words:** *Brassica napus* L.; cytoplasmic male sterility; shape of flower organs; cytological observation; fertility identification

杂种优势是生物界普遍存在的现象,利用杂种优势进行新品种选育已经成为作物产量和品质提高的主要途径。雄性不育系在作物杂种优势利用中发挥着重要作用。雄性不育按基因型可分为细胞核雄性不育、细胞质雄性不育和核质互作雄性不育。其中,细胞质雄性不育(Cytoplasmic male sterility, CMS)表现为花粉囊和小孢子发育异常,导致不能产生花粉或花粉败育,但卵细胞发育正常,可接受外来花粉而正常结实,是母性遗传,即细胞质遗传<sup>[1]</sup>。细胞质雄性不育是植物界普遍存在的现象,揭示作物细胞质雄性不育的败育机理、鉴定其不育类型对不育系的利用具有重要意义。

传统的作物细胞质雄性不育类型的培育与鉴定方法是杂交试验,这种方法工作量大、鉴定周期长。蔡明等<sup>[2]</sup>从甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)和埃塞俄比亚芥(*Brassica carinata* Br)的远缘杂交后代中选育出 NCa 细胞质雄性不育型(NCa CMS)材料。Wan 等<sup>[3]</sup>通过对野生芥菜雄性不育系的不断连续回交,然后将该不育的细胞质导入到甘蓝型油菜中,进而成功地选育出 Hau CMS 材料。李殿荣<sup>[4]</sup>在甘蓝型油菜 S74-3×(丰收 4 号+7207)的复交后代中发现了不育植株,并成功培育出不育系陕 2A、保持系陕 2B 及其恢复系垦 C1、垦 C2 等。随着分子生物学的发展,根据特异性基因序列进行 PCR 标记成为作物细胞质雄性不育类型鉴定新的手段和工具。多重 PCR 能够通过使用多对引物同时扩增许多靶基因<sup>[5]</sup>,该技术已用于鉴定小麦同源糯性位点的突变类型<sup>[6]</sup>、洋葱细胞质类型<sup>[7]</sup>。Zhao 等<sup>[8]</sup>利用多重 PCR 方法在油菜 Ogu NWSUAF CMS 不育胞质材料中同时扩增出 *orf138* 和 *orf222* 基因的条带。舒畅<sup>[9]</sup>利用多重 PCR 方法实现

了 NRO4270A CMS、Pol CMS、Ogu CMS、Kos CMS 和 WNJ01A CMS 5 种细胞质不育材料的分子区分。

22N317A、22N195R<sub>2</sub>A 和 22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 是甘肃农业大学培育的 3 个甘蓝型油菜细胞质雄性不育材料。为促进上述材料的生产应用,本研究以上述 3 个材料的不育系和保持系为材料,通过花器形态观察、花粉细胞常规压片和石蜡切片观察及多重 PCR 方法,鉴定 3 个材料细胞质雄性不育类型,明确其败育时期和败育原因,为 3 个不育材料的合理利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与方法

本试验所用的雄性不育系材料 22N317A、22N195R<sub>2</sub>A、22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 及其保持系材料 22N317B、22N195R<sub>2</sub>B、22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>B 均由省部共建干旱生境作物学国家重点实验室油菜课题组提供。试验材料种植于甘肃省平凉市南湖镇农业技术推广中心油菜育种研究基地,每个材料种植 2 m<sup>2</sup>,60 株,行距为 30 cm,株距为 15 cm,按当地常规措施进行田间管理。于油菜现蕾期和开花期取不育系与保持系材料的油菜花朵各 3 朵,进行花器形态观察;根据花蕾长度与花粉发育阶段的关系(表 1),于油菜现蕾期取花蕾长度 0~1.0 mm、1.1~2.0 mm、2.1~3.0 mm、3.1~4.0 mm、4.1~5.0 mm 不育系与保持系材料各 10 个花蕾新鲜样品进行不育系花粉细胞学观察;于油菜 3 叶期,随机选取不育系与保持系材料各 10 株取叶片进行总 DNA(gDNA)和线粒体 DNA(mtDNA)提取,并通过多重 PCR 鉴定不育系的不育类型。

表 1 甘蓝型油菜细胞质雄性不育系与保持系花蕾长度与花粉发育时期的对应关系

Table 1 The corresponding relationship between bud length and pollen development period of cytoplasmic male sterile line and maintainer line in *Brassica napus* L.

花蕾长度(mm)	0~1.0	1.1~2.0	2.1~3.0	3.1~4.0	4.1~5.0
花粉发育阶段	花粉母细胞时期	四分体时期	单核小孢子时期	双核小孢子时期	成熟花粉粒时期

### 1.2 细胞学观察

1.2.1 常规压片 将现蕾期获得的不育系与保持系不同长度的花蕾,用镊子将花蕾剥开,取出 1~2 个

花药,置于载玻片上,并反复地轻轻挤压花药,使花粉母细胞溢出。使用吸管吸取 1% 的醋酸洋红对花粉母细胞进行染色 2~3 min,并去除花药壁上的残

留杂质。然后用盖玻片盖好染色花粉母细胞,使得染色液正好充满载玻片和盖玻片之间的间隙,形成一薄层,利用滤纸吸除盖玻片四周的染料。在 RVL-100-G 正倒置一体荧光显微镜(美国 ECHO 公司产品)下进行观察。

1.2.2 石蜡切片 参照文献[10]的方法对现蕾期不育系与保持系不同长度的花蕾进行石蜡切片观察。切片时,打开展片机并将其预热至恒定的 37 ℃,然后将包埋组织的蜡块精确地切成 4 μm 厚的均匀蜡片。展片时,将处理好的载玻片放入 37 ℃ 的烘箱中过夜晾干,保存。封片时,用中性树胶滴在封片后将其放入 37 ℃ 的烘箱中过夜晾干。使用 RVL-100-G 正倒置一体的荧光显微镜进行花蕾石蜡切片观察。

### 1.3 不育系不育胞质类型鉴定

采用 CTAB 法提取 3 个不育系 3 叶期叶片总 DNA(gDNA),采用线粒体 DNA(mtDNA)提取试剂盒(上海尚宝生物科技有限公司产品)提取线粒体 DNA(mtDNA)。以 3 个不育系的 mtDNA 为模板及 *orf138*、*orf222*、*orf224*、*orf139* 等基因的引物<sup>[11]</sup>(表 2)对不育系不育胞质类型进行鉴定。其中,引物 1~3 分别用于鉴定 Ogu CMS、Pol CMS 和 Nap CMS 3 种不育胞质类型,引物 4 用于检查总 gDNA 样本中是否混有 mtDNA。根据 NCBI 报道的油菜核不育基因 *MS<sub>2</sub>Bnap* 和 *BnMS<sub>1</sub>* 分别设计引物 5 和引物 6,检测 mtDNA 样品中是否混有 gDNA。单一引物 PCR 反应体系总体积为 11.0 μL,包括不育材料 mtDNA 1.0 μL,2×Pro Taq Master Mix 5.0 μL,上下游引物各 0.9 μL,3.2 μL ddH<sub>2</sub>O。多重 PCR 反应体系总体积亦为 11.0 μL,包括 mtDNA 1.0 μL,2×Pro Taq Master Mix 5.0 μL,Ogu CMS、Pol CMS 和 Nap CMS 不育类型扩增基因 *orf138*、*orf222* 和 *orf224* 的上下游引物各 0.3 μL,3.2 μL ddH<sub>2</sub>O。单一引物 PCR 和多重 PCR 反应程序均为:95 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后,取 10 μL PCR 产物在 1×TAE buffer 中使用 1.5% 琼脂糖凝胶进行平板电泳分离。应用溴化乙锭对条带进行染色,并在紫外线下观察、拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 花器形态特征

从图 1 可以看出,3 组甘蓝型冬油菜不育系与

保持系之间花器官形态差异显著。保持系和不育系花蕾数量相差不大,花瓣均较为平展。但保持系花丝较长,花药饱满其中有很多成熟花粉粒,大部分花粉可以正常开裂并散出;不育系花丝短小,柱头高于花药,花药干瘪弱小,发育异常,不能正常散粉,导致不育。

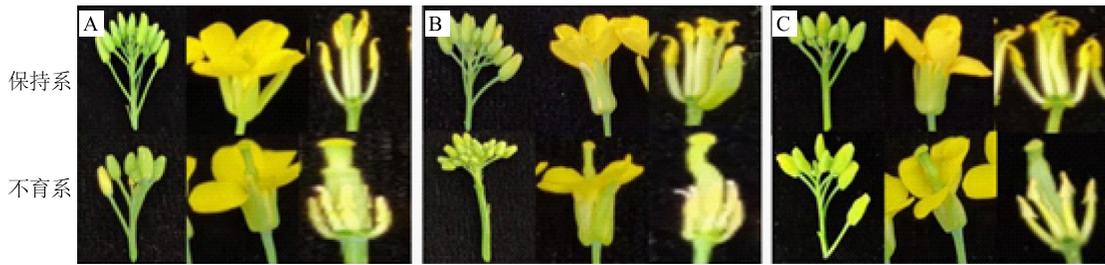
表 2 引物序列信息

Table 2 Information of primer sequences

编号	序列(5'→3')	靶基因
1	F:GAAACGGGAAGTACAAAT R:GCATTAATTTCTCGGTCAT	<i>orf138</i>
2	F:AGCTGTCTGGAGGGAATC R:GCGGTCTCAGGCACTAATC	<i>orf222</i>
3	F:AGCTGTCTGGAGGGAATC R:ACGACATCAAGGAGGAAC	<i>orf224</i>
4	F:ATGGGACTCACCCCTTACTTGA R:CCGTGCGAGAAAAGAGATCC	<i>orf139</i>
5	F:CAGATTACAGCAGAGGAGATTGC R:GAAGCTCAGCTAAGTCCTCG	<i>MS<sub>2</sub>Bnap</i>
6	F:ATGATAGTTTCATTGATTCAAATTCATA R:TCAAGGCCAAAAAGAGAGAGGAA	<i>BnMS<sub>1</sub></i>

### 2.2 花粉细胞的形态结构特征

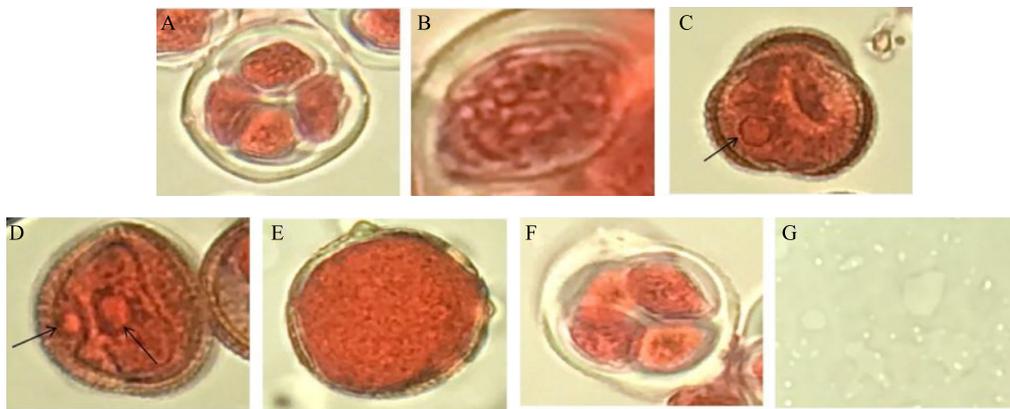
2.2.1 常规压片观察的花粉细胞 保持系 22N317B 和不育系 22N317A 花粉细胞常规压片如图 2 所示。保持系 22N317B 花粉母细胞经过 2 个减数分裂周期形成四分体(图 2A),四分体周围充满了胼胝质,胼胝质逐渐消解后,四分体进入单核早期,四分体释放出单个圆形的小孢子,但细胞核不清晰(图 2B),接着进入单核靠边期,细胞核在细胞一侧,细胞核此时清晰可见,整个细胞呈现三瓣状构造(图 2C),最后细胞核经过有丝分裂,形成大小不等的 2 个核,进入双核期,较大的细胞核位于细胞的中心,较小的细胞核位于细胞一侧(图 2D),小孢子继续生长进入花粉成熟期,花粉粒颜色较深,细胞核不清晰,形态趋于圆润充实(图 2E)。不育系 22N317A 经 2 轮减数分裂形成规整的四分体结构(图 2F),但在四分体之后并没有观察到小孢子或者花粉粒(图 2G),可能是四分体时期之后发生了降解,表明花药很有可能在四分体至单核小孢子期间败育。另外 2 组材料的花粉细胞发育的细胞形态学特征与其相似。



A:保持系 22N317B,不育系 22N317A;B:保持系 22N195R<sub>2</sub>B,不育系 22N195R<sub>2</sub>A;C:保持系 22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>B,不育系 22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A。

图 1 3 组保持系和不育系的花器形态

Fig.1 Floral morphology of three groups of maintainer lines and sterile lines



A:保持系 22N317B 四分体;B:保持系 22N317B 早期小孢子;C:保持系 22N317B 单核小孢子;D:保持系 22N317B 双核小孢子;E:保持系 22N317B 花粉粒;F:不育系 22N317A 四分体;G:不育系 22N317A 花粉粒。箭头所指为细胞核。

图 2 保持系 22N317B 和不育系 22N317A 花粉细胞常规压片细胞形态学观察结果

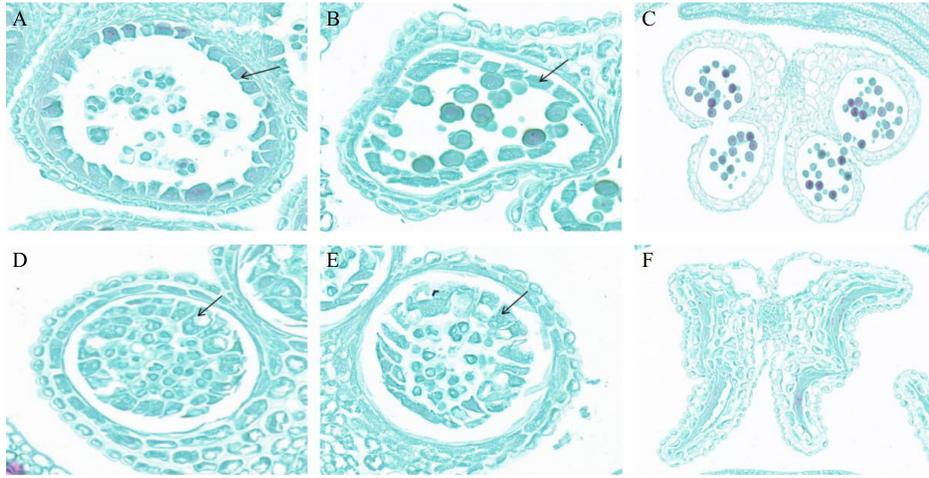
Fig.2 Morphological observation of conventional tabletting cells of maintainer line 22N317B and sterile line 22N317A

2.2.2 石蜡切片观察的花粉细胞 保持系 22N317B 和不育系 22N317A 花粉细胞发育过程中的石蜡切片如图 3 所示。可育系 22N317B 花粉母细胞经过减数分裂形成四分体,绒毡层逐渐降解(图 3A),接着进入单核小孢子晚期,细胞核偏移(图 3B),随着绒毡层的降解花粉进入成熟期,绒毡层消失,花粉粒变为椭圆形,颜色变深,可以观察到 4 个花粉囊,花粉囊开裂,释放花粉(图 3C)。不育株 22N317A 在四分体时期,绒毡层增大,绒毡层细胞内含有大液泡,液泡将细胞核和细胞质挤到细胞一边,使得细胞质浓缩(图 3D),随着进一步的发育,未形成小孢子,且绒毡层进一步增大,向内挤压四分体,药室体积变小(图 3E),最后绒毡层和四分体全部消失,整个花粉囊萎缩(图 3F)。根据石蜡切片结果可知,不育系 22N317A 花粉细胞四分体后小孢子不能被释放出来,同时绒毡层异常膨大,向内挤

压四分体,致使药室变形,最终导致败育。另外 2 组材料的花粉细胞发育的结果与其类似。

### 2.3 mtDNA 和 gDNA 的分离纯化

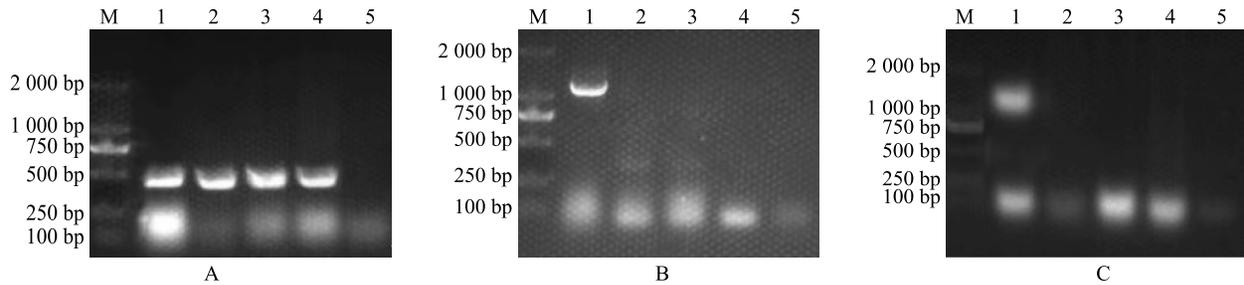
以任一不育系 gDNA 和 3 个不育系 mtDNA 为模板,利用引物 4 对 *orf139* 基因进行 PCR 扩增得到的电泳图谱如图 4A 所示,从图中可以看出,泳道 1~4 均出现 500 bp 左右的条带,说明 *orf139* 的目标片段在所有的 mtDNA 和 gDNA 样本中都被扩增到,因此说明分离的 gDNA 中含有 mtDNA,基因的特异性可以通过 mtDNA 模板表达出来。利用引物 5 和引物 6 分别对核基因 *MS<sub>2</sub>Bnap* 和核基因 *BnMS<sub>1</sub>* 进行 PCR 扩增得到的电泳图谱如图 4B 和图 4C 所示,从图中可以看出,图 4B 和 4C 结果是相同的,均是泳道 1 出现 1 000 bp 左右的条带,泳道 2~4 均没有出现条带,说明以 mtDNA 作为模板没有得到 PCR 产物,分离的 mtDNA 为 gDNA 的一部分。



A:保持系 22N317B 四分体期;B:保持系 22N317B 单核小孢子期;C:保持系 22N317B 花粉粒成熟期;D:不育系 22N317A 四分体期;E:不育系 22N317A 四分体期的花粉囊;F:不育系 22N317A 败育花粉囊。箭头所指为绒毡层。

图3 保持系 22N317B 和不育系 22N317A 花粉细胞石蜡切片细胞形态学观察结果

Fig.3 Morphological observation of paraffin section cells of maintainer line 22N317B and sterile line 22N317A



A: *orf139* 特异性引物(引物 4);B: *MS<sub>2</sub>Bnap* 特异性引物(引物 5);C: *BnMS<sub>1</sub>* 特异性引物(引物 6)。M: Marker;1:以 3 个不育系中任意一个 gDNA 为模板;2~4 依次为不育系 22N317A、22N195R<sub>2</sub>A、22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 的 mtDNA 分别为模板;5:阴性对照(ddH<sub>2</sub>O 为模板)。

图4 不同引物扩增的 PCR 产物电泳图谱

Fig.4 Electrophoretogram of PCR products amplified with different primers

## 2.4 不育胞质类型

以不育系 22N317A、22N195R<sub>2</sub>A、22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 的 mtDNA 为模板,利用引物 1、引物 2 和引物 3 分别进行 PCR 扩增,扩增产物的电泳图谱如图 5 所示。从图中可以看出,利用引物 1 进行 PCR 扩增,3 个不育系材料扩增产物的电泳图谱均出现 465 bp 的条带(图 5A);利用引物 2 进行 PCR 扩增,3 个不育系材料扩增产物的电泳图谱中均出现 1 102 bp 的条带(图 5B);而 3 个不育系材料引物 3 扩增产物的电泳图谱中均没有出现条带(图 5C)。由于 465 bp、1 102 bp 和 747 bp 条带分别是 Ogu CMS、Nap CMS 和 Pol CMS 不育胞质类型的分子标记<sup>[8]</sup>,因此单个引物 PCR 扩增产物的电泳图谱无法判断 3 个不育系材料的不育胞质类型。

以不育系 22N317A、22N195R<sub>2</sub>A、22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 的 mtDNA 作为模板,以引物 1、引物 2 与引物 3 进行多重 PCR 扩增,扩增产物的电泳图谱如图 6 所示。由图可知,3 个不育系材料都出现了 465 bp 和 1 102 bp 特定组合的条带。由于油菜不育胞质类型与各自 PCR 产物的特定组合有关,465 bp 和 500 bp 条带组合是 Ogu CMS 材料的特异性条带组合,747 bp 和 500 bp 条带组合是 Pol CMS 材料的特异性条带组合,1 102 bp 和 800 bp 条带组合是 Nap CMS 材料的特异性条带组合,465 bp 和 1 102 bp 条带组合是 Ogu NWSUAF CMS 材料的特异性条带组合<sup>[8]</sup>。因此,本研究使用的 3 个不育系材料的不育胞质类型均为 Ogu NWSUAF CMS。

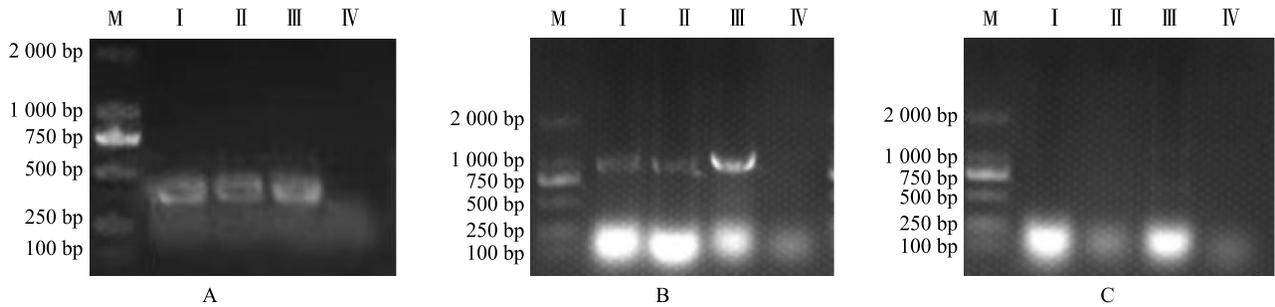
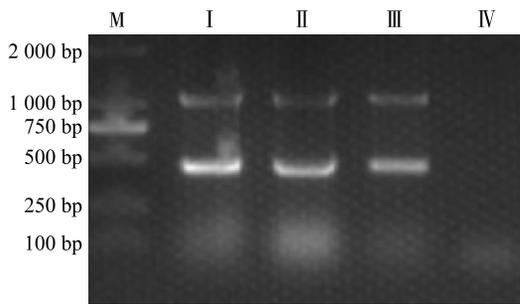


图 5 以 mtDNA 为模板的不同引物 PCR 扩增产物的电泳图谱  
A:引物 1;B:引物 2;C:引物 3。泳道 I、II、III:分别以不育系 22N317A、22N195R<sub>2</sub>A、22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 的 mtDNA 为模板;泳道 IV:以 ddH<sub>2</sub>O 为模板的阴性对照。

图 5 以 mtDNA 为模板的不同引物 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig.5 Electrophoretogram of PCR products amplified by different primers using mtDNA as template



泳道 I、II、III:依次以不育系 22N317A、22N195R<sub>2</sub>A、22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 的 mtDNA 为模板;泳道 IV:以 ddH<sub>2</sub>O 为模板的阴性对照。

图 6 多重引物 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig.6 Electrophoretogram of PCR products amplified by multiplex primers

### 3 讨论与结论

#### 3.1 3 组甘蓝型油菜不育系和保持系的花器官形态特征

花器作为作物的生殖器官,在不育系和可育系之间存在明显的差异。王开芳等<sup>[12]</sup>研究结果表明,恢复系 1831R 植株开花时,花药较大,正常散粉,柱头高度与花药高度几乎一致;而不育系 105A 的花药小且干瘪,无花粉,但雌蕊发育正常,雄蕊长度不到花柱的一半。本研究的 3 个不育系材料花器官的形态与王开芳等<sup>[12]</sup>的研究结果一致。

#### 3.2 不育系花粉败育发生的时期和败育原因

花粉发育过程中,任何时期出现异常均会导致雄性不育花粉,花粉败育发生的时期和原因存在较大差异<sup>[13]</sup>。王开芳等<sup>[12]</sup>采用石蜡制片法,对甘蓝

型油菜杂交种青杂 5 号的雄性不育系 105A 及其恢复系 1831R 的小孢子发生和花药发育过程进行观察,研究结果表明,在不育系 105A 花粉败育过程中,一部分发生于造孢细胞时期;另一部分发生于单核晚期,其特点为单核晚期绒毡层细胞膨大向小孢子靠近,并逐步降解,其破裂胞质退化残余物侵入药室,与小孢子混合粘连在一起,甚至有些绒毡层细胞整块脱落,成为染色很深的团块状物质,占据药室一部分空间,最终小孢子降解,花粉败育。刘燕等<sup>[14]</sup>通过石蜡切片显微镜观察,发现甘蓝型油菜雄性不育系 212A 在孢原细胞阶段遭受发育阻碍,没有出现造孢细胞和花粉囊的分化。唐鑫等<sup>[15]</sup>采用醋酸洋红染色法和石蜡切片法对温敏细胞核雄性不育系 160S 花药进行细胞学观察,结果表明 160S 属花粉母细胞败育型不育系,败育时期发生在减数分裂期,绒毡层异常降解,绒毡层未向腺质型转化,不能提供花粉母细胞发育所需要的营养物质,致使花粉母细胞发育受阻,无法形成四分体结构,从而导致小孢子无法形成,花药形成空的花粉囊,产生雄性不育。本研究通过常规压片及石蜡切片观察结果显示,3 个不育系材料的败育时期为四分体至单核花粉粒期间,败育的原因主要在于四分体时绒毡层细胞大液泡化且径向增大,向内挤压四分体,最终导致药室变形和花粉败育。这与胡丽娇<sup>[16]</sup>研究的 Ogura 型细胞质雄性不育系大白菜的败育机制一致。

#### 3.3 3 个不育系的不育类型鉴定

植物细胞质雄性不育的机理与线粒体上特异基因的表达密切相关,不同的细胞质雄性不育系都有其特有的不育基因<sup>[17-18]</sup>。线粒体基因组中 *orf138* 基因编码 *orf138* 蛋白,引起 Ogu CMS<sup>[19]</sup>;而 *orf222*

和 *orf224* 基因的表达分别引起 Nap CMS 和 Pol CMS<sup>[20]</sup>。利用不育基因进行引物设计并进行 PCR 扩增,可以得到该不育胞质类型特异性分子标记<sup>[21]</sup>,但单引物 PCR 往往不能准确地确定油菜不育胞质类型,而通过多重 PCR 则可以快速区分不育胞质类型<sup>[8]</sup>。张德双<sup>[22]</sup>用 *atp6* 基因和 *orf222* 基因引物组,通过多重 PCR 扩增,实现了 3 种大白菜不育系的区分。李建斌等<sup>[23]</sup>在 6 个结球甘蓝 CMS 植株中发现大多数单株中可以同时检测到 *orf138* 基因和 *orf222* 基因,这结果表明该类不育系可能是 Ogura CMS 和 Nap CMS 两种类型的杂合体。

本研究利用 *orf138*、*orf222*、*orf224* 基因的 3 对特异性引物,对 22N317A、22N195R<sub>2</sub>A 和 22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A3 个甘蓝型冬油菜不育系 mtDNA 进行多重 PCR 扩增,扩增产物中都出现 465bp 和 1 102 bp 组合的条带。因此,22N317A、22N195R<sub>2</sub>A 和 22LJ56A-22N286R<sub>1</sub>A 3 个不育系均为 Ogu NWSUAF CMS。

#### 参考文献:

- [1] 姚 鸿,谢纬武,李传友,等. D-2 型小麦细胞质雄性不育系及其保持系和恢复系线粒体 DNA 的比较研究[J]. 遗传学报, 1998, 25(1): 1-7.
- [2] 蔡 明,刘贵华,秦选佑. 甘蓝型油菜雄性不育的遗传研究: LNCa 甘蓝型油菜异核型雄性不育材料选育初报[J]. 中国油料, 1993, 15(4): 1-3, 7.
- [3] WAN Z J, JING B, TU J X, et al. Genetic characterization of a new cytoplasmic male sterility system (hau) in *Brassica juncea* and its transfer to *B.napus*[J]. Theor and Appl Genet, 2008, 116(3): 355-362.
- [4] 李殿荣. 甘蓝型油菜三系选育初报[J]. 陕西农业科学, 1980 (1): 26-29.
- [5] CHAMBERLAIN J S, GIBBS R A, RAINER J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucl Acids Res, 1988, 16(23): 11141-11156.
- [6] NAKAMURA T, VRINTEN P, SAITO M, et al. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers[J]. Genome, 2002, 45(6): 1150-1156.
- [7] KIM S, LEE E T, CHO D Y, et al. Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing among three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.)[J]. Theor and Appl Genet, 2009, 118(3): 433-441.
- [8] ZHAO H X, LI Z J, HU S W, et al. Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by a multiplex PCR assay[J]. Theor and Appl Genet, 2010, 121(4): 643-650.
- [9] 舒 畅. 甘蓝型油菜萝卜甘蓝细胞质雄性不育系 NRO4270A 的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2011.
- [10] 金姣姣. 基于生长锥和下胚轴分析甘蓝型冬油菜的抗寒性机制[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2020.
- [11] 危文亮,王汉中,刘贵华. 甘蓝型油菜新型细胞质雄性不育系 NCa 不育胞质类型的分子鉴定[J]. 中国农业科学, 2005, 38(10): 1965-1972.
- [12] 王开芳,张咏梅,张金文,等. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育系 105A 花药败育的细胞学观察[J]. 中国农学通报, 2015, 31(13): 76-80.
- [13] WANG S P, ZHANG G S, SONG Q L, et al. Abnormal development of tapetum and microspores induced by chemical hybridization agent SQ-1 in wheat[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119557.
- [14] 刘 燕,董振生,张改生,等. 甘蓝型油菜 CMS 212A 花药发育的细胞学研究[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 33-37.
- [15] 唐 鑫,李圆圆,陆俊杏,等. 甘蓝型油菜温敏细胞核雄性不育系 160S 花药败育的形态学特征和细胞学研究[J]. 作物学报, 2021, 47(5): 983-990.
- [16] 胡丽姣. 基于 RNA-seq 对大白菜 Ogura 型细胞质雄性不育机制的研究[D]. 郑州:郑州大学, 2022.
- [17] HANSON M R, BENTOLILA S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development[J]. The Plant Cell, 2004, 16(S): 154-169.
- [18] 张祖新,方明镜,杜何为,等. 基于 PCR 技术的玉米 CMS 材料胞质类型的快速鉴定[J]. 作物学报, 2005, 31(10): 1386-1388.
- [19] BELLAOUI M, PELLETIER G, BUDAR F. The steady-state level of mRNA from the Ogura cytoplasmic male sterility locus in *Brassica cybrids* is determined post-transcriptionally by its 3' region[J]. The EMBO Journal, 1997, 16(16): 5057-5068.
- [20] 俞咪娜,董媛媛,徐攀峰,等. 油菜胞质不育类型相关基因研究进展[J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊 1): 7-11.
- [21] 陈黎明,柳李旺,晋 萍,等. 两个萝卜雄性不育材料胞质的细胞学与分子鉴定[J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 757-762.
- [22] 张德双. 大白菜 CMS96 细胞质雄性不育的分子特性及育种应用研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2006.
- [23] 李建斌,张海娟,余小林,等. 结球甘蓝细胞质雄性不育(CMS)类型的分子鉴定[J]. 分子植物育种, 2009, 7(6): 1149-1153.

(责任编辑:石春林)