分子植物育种(网络版), 2011 年, 第 9 卷, 第 1382–1388 页
Fenzi Zhiwu Yuzhong (Online), 2011, Vol.9, 1382–1388
http://mpb. 5th.sophiapublisher.com

研究报告
A Letter

利用分子标记辅助选育白菜 Y02 甲型“两用系”

杨宁, 李跃飞, 刘志勇, 冯辉
沈阳农业大学园艺学院, 沈阳, 110866
通讯作者: fenghuiaaa@263.net; 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 51 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0051
收稿日期：2011 年 01 月 10 日
接受日期：2011 年 04 月 18 日
发表日期：2011 年 04 月 28 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:
杨宁等, 2011, 利用分子标记辅助选育白菜 Y02 甲型“两用系”, 分子植物育种 Vol.9 No.51 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0051)

摘 要 本研究以复等位基因遗传的白菜核基因雄性不育系(*Msms*)为不育源，以花心白菜‘宫古花蕊’Y02(Ms^fMs^f)为轮回亲本，采用连续回交、杂交和自交的转育方法，利用与不育基因 *Ms* 连锁的 SCAR 标记 syau-scr04 辅助不育基因 *Ms* 选择，成功地将不育基因转入到可育品系“Y02”中，育成了分离比例为 1:1，植物学性状与“Y02”相近的新甲型“两用系”。选择结果表明 syau-scr04 选择的准确率均为 100%，验证了该标记可用于白菜类蔬菜作物甲型“两用系”转育辅助选择。

关键词 白菜; 分子标记辅助选择; 甲型“两用系”; 转育

The AB Line Type Ⅰ of Chinese Cabbage Y02 (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*) Developed by Molecular Marker Assisted Selection

Yang Ning, Li Yuefei, Liu Zhiyong, Feng Hui
Department of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, 110866, P.R. China
Corresponding author, fenghuiaaa@263.net; Authors

Abstract A multiple Allele inherited genetic male sterile line of Chinese cabbage was used as the source of male sterility, crossing, backcrossing and selfing were applied to transfer the male sterility to male fertile line Y02. The SCAR marker syau-scr04 which linked to the male sterility gene *Ms*, was applied in the selection of *Ms*. The new AB line type Ⅰ, which contained similar botanical characters with Y02, was obtained successfully. The selection results showed that the accuracy of marker syau-scr04 had reached 100%, which indicated that the marker could be applied in the marker assisted selection of AB line type Ⅰ in *Brassica*.

Keywords Chinese cabbage; Molecular marker assisted selection (MAS); AB line type Ⅰ; Breeding

研究背景

大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)具有显著的杂种优势，而雄性不育系在制种过程中的应用是配制杂交种的理想途径。Feng 等(1995)发现的大白菜核基因雄性不育材料，其不育株率和不育度均达到 100%，并且植物学性状优良，是白菜类蔬菜作物理想的雄性不育源材料。根据“核不育复等位基因遗传假说”(冯辉等, 1995; Feng et al., 1998)，该类核不育材料的不育性受同一位点 3 个基因控制，即 Ms^f>*Ms*>*ms*。为了使这类不育材料得到更为广泛的应用，冯辉等(2007)设计了大白菜核不育系定向转育方案，采用常规有性杂交、回交、自交等方法实施转育，通过与轮回亲本连续回交转育性状，利用与已知基因型的核不育材料测交鉴定入选植株的基因型，这种方法不仅可以转育不育基因，而且还能兼顾园艺学性状的转育。利用该方法已成功将大白菜核不育复等位基因转入多种白菜类蔬菜作物中，育成了新的雄性不育系(冯辉, 2007; 辛彬, 2009)。

由于该类不育材料特殊的遗传机制，在甲型“两用系”转育过程中，会出现表现型为全可育，而植株基因型却不同的群体(Ms^fMs^f; Ms^fMs)，仅凭花期育性不能在当代区分植株基因型。为选择基因型为 Ms^fMs 的可育单株进行回交，只能通过测交鉴定基因型的方法，势必会增加工作量及延缓转育进程。分子标记辅助选择技术是通过利用与目标性状紧密连锁的 DNA 分子标记对目标性状进行间接选择的现代育种技术，该方法可在不受环境和生育期

限制的情况下进行早代选择，从而提高育种效率。沈向群等(2004)筛选到 1 个与恢复基因 Ms^f 连锁的 RAPD 标记。张淑江等(2008)获得 1 个与显性核不育基因连锁的 SCAR 标记。袁鹤等(2009)将大白菜雄性不育基因定位于 4 号染色体上。刘志勇(2010)开发了 3 个与不育基因 *Ms* 连锁的 SCAR 标记。王丽丽(2010)利用标记 syau-scar01 辅助选育了大白菜“a20”核基因雄性不育系。本试验以花心白菜可育品系‘宫古花蕊’为试材，利用核不育复等位基因遗传的白菜雄性不育材料为不育源，选择冯辉等(2009)开发的与该不育基因 *Ms* 连锁的 SCAR 标记 syau-scr04 进行辅助选择，育成了新的甲型“两用系”。

1 结果与分析

1.1 可育品系“Y02”基因型鉴定

以白菜核不育系 06SX110(*Msms*)为母本，与可育品系“Y02”杂交，F_1 代全部为可育株(可育株:不育株=96:0)，说明可育品系“Y02”的基因型为 Ms^fMs^f。

1.2 标记 syau-scr04 在亲本间的多态性

经验证，标记 syau-scr04 扩增带型在不育源 06SX090 (*MsMs*)与待转育品系“Y02”之间存在明显的多态性(图 1)，可用于 *Ms* 基因的分子标记辅助选择。

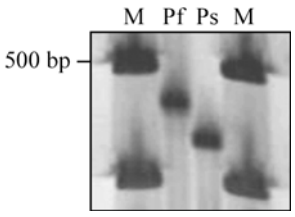

图 1 标记 syau-scr04 在亲本间的多态性

注: M: DL2000 marker; Pf: 可育品系(Ms^fMs^f); Ps: 不育株(*MsMs*)

Figure 1 Amplification results of syau-scr04 in parents

Notes: M: DL2000 marker; Pf: Fertile inbred line “Y02” (Ms^fMs^f); Ps: Sterile plant (*MsMs*)

1.3 不育基因 *Ms* 的分子标记辅助选择

利用测交方法鉴定 BC_1 群体基因型(表 1)。对标记 syau-scr04 的准确性在 BC_2 群体中进行验证。随机选取 BC_2 群体 (Ms^fMs^f 和 Ms^fMs)植株 50 株，利用标记 syau-scr04 对含 *Ms* 基因的植株进行辅助选择，同时 50 株植株与不育系(*Msms*)测交验证选择的准确性。结果表明，标记 syau-scr04 在 22 株植株中扩增出特异带(图 2)，与测交鉴定结果一致(表 2)，说明选择的准确率为 100%，可应用于 Ms^fMs 基因型植株的分子标记辅助选择。

表 1 BC_1Ms^fMs 基因型鉴定结果

Table 1 The results of the genotype check for breeding male sterile line in BC_1

代号 Code	组合 Combination	可育株：不育株 Fertile plants:sterile plants	理论分离比例($X^2_{0.05,1}$=3.841) Theoretical ratio ($X^2_{0.05,1}$=3.841)
BC_1	06sx110×((06sx110×Y02)-3×Y02)-6	32:26	1:1(0.431)

表 2 分子标记检测及测交鉴定验证 BC_2 植株基因型结果

Table 2 Results of the genotype tested with syau-scr04 and testcross in BC_2

代号 Code	扩增结果 Screening result (syau-scr04)	可育株:不育株 Fertile plants: Sterile plants	理论分离比例($X^2_{0.05,1}$ = 3.841) Theoretical ratio ($X^2_{0.05,1}$ = 3.841)	基因型 Genotype
1	-	52:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
2	=	28:26	1:1(0.018)	Ms^fMs
3	=	21:24	1:1(0.089)	Ms^fMs
4	-	47:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
5	=	27:25	1:1(0.019)	Ms^fMs

续表 2
Continuing table 2

代号 Code	扩增结果 Screening result (syau-scr04)	可育株:不育株 Fertile plants: Sterile plants	理论分离比例($X^2_{0.05,1}=3.841$) Theoretical ratio ($X^2_{0.05,1}=3.841$)	基因型 Genotype
6	-	48:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
7	-	50:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
8	-	45:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
9	=	26:21	1:1(0.340)	Ms^fMs
10	-	39:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
11	-	41:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
12	=	25:23	1:1(0.571)	Ms^fMs
13	=	26:30	1:1(0.161)	Ms^fMs
14	=	25:19	1:1(0.568)	Ms^fMs
15	-	45:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
16	-	51:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
17	=	24:16	1:1(0.148)	Ms^fMs
18	-	47:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
19	=	22:20	1:1(0.023)	Ms^fMs
20	-	42:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
21	-	48:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
22	-	50:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
23	=	23:20	1:1(0.093)	Ms^fMs
24	=	28:26	1:1(0.018)	Ms^fMs
25	-	37:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
26	=	25:23	1:1(0.571)	Ms^fMs
27	-	55:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
28	=	25:26	1:1(0.000)	Ms^fMs
29	-	54:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
30	-	41:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
31	=	28:25	1:1(0.075)	Ms^fMs
32	-	46:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f
33	-	44:0	全可育 All fertile	Ms^fMs^f

续表 2

Continuing table 2

代号 Code	扩增结果 Screening result (syau-scr04)	可育株:不育株 Fertile plants: Sterile plants	理论分离比例($X^2_{0.05,1}=3.841$) Theoretical ratio ($X^2_{0.05,1}=3.841$)	基因型 Genotype
34	=	20:27	1:1(0.765)	*Ms*^{f}*Ms*
35	=	16:25	1:1(1.561)	*Ms*^{f}*Ms*
36	=	23:14	1:1(1.729)	*Ms*^{f}*Ms*
37	=	21:24	1:1(0.089)	*Ms*^{f}*Ms*
38	-	38:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}
39	-	36:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}
40	-	46:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}
41	=	36:27	1:1(1.016)	*Ms*^{f}*Ms*
42	-	52:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}
43	-	43:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}
44	-	45:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}
45	=	24:17	1:1(0.878)	*Ms*^{f}*Ms*
46	-	51:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}
47	=	22:24	1:1(0.042)	*Ms*^{f}*Ms*
48	-	47:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}
49	=	29:20	1:1(1.306)	*Ms*^{f}*Ms*
50	-	43:0	全可育 All fertile	*Ms*^{f}*Ms*^{f}

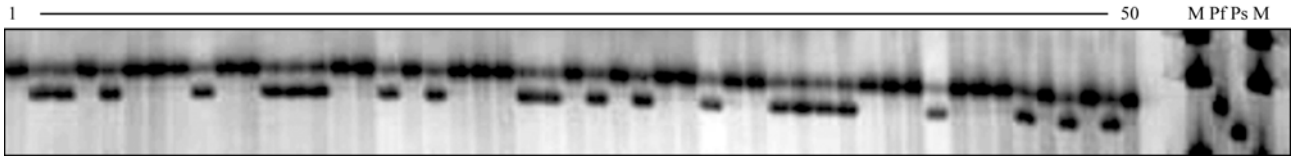

图 2 标记 syau-scr04 鉴定 BC_2 植株基因型结果

Figure 2 Results of the genotype tested by syau-scr04 in BC_2

从 BC_3 群体中随机选取 13 株植株(至少 7 株)，利用标记 syau-scr04 进行扩增选择，选择结果表明，在第 2、4、5、6、8、9、11 号单株上扩增出清晰的特异带(图 3A)；从 BC_4 群体中随机选取 13 株植株(至少 7 株)，利用标记 syau-scr04 进行扩增选择，选择结果表明，在第 3’、4’、5’、7’、8’、9’、12’单株上扩增出清晰的特异带(图 3B)，选择 8’号单株自交，其后代育性出现分离(可育株：不育株为 3:1)，遗传模式为：*Ms*^{f}*Ms*⊗→*Ms*^{f}*Ms*^{f}，*Ms*^{f}*Ms*，*MsMs*。

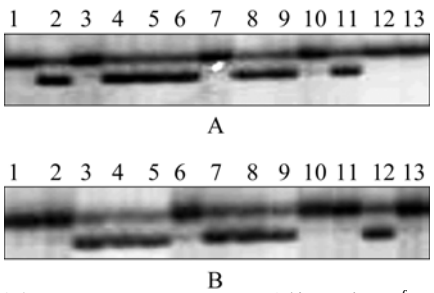

图 3 A: BC_3syau-scr04 对基因型 *Ms*^{f}*Ms* 的选择; B: BC_4 syau-scr04 对基因型 *Ms*^{f}*Ms* 的选择

Figure 3 A: Selection results for *Ms*^{f}*Ms* using syau-scr04 in BC_3; B: Selection results for *Ms*^{f}*Ms* using syau-scr04 in BC_4

1.4 新甲型“两用系”的配制

通过标记 syau-scr04 扩增选择可判断 BC_4 中 8’号单株的基因型为 Ms^fMs，其自交后代育性表现为 3:1 分离，在其自交后代群体中，选 7 株可育株与不育株进行兄妹交，兄妹交后代 1:1 分离，可断定基因型为 Ms^fMs 和 $MsMs$，即新甲型“两用系”。遗传模式如下：$MsMs\times Ms^fMs^f\rightarrow Ms^fMs$ 全可育(All fertile)；$MsMs\times Ms^fMs\rightarrow Ms^fMs$，$MsMs$ 1:1 (可育 fertile:不育 sterile)。

2 讨论

目前，分子标记辅助选择育种已在许多大田作物中得到了应用(Liang et al., 2004; Gao et al., 2008; Sang et al., 2006)。本试验将此方法应用于白菜类蔬菜作物甲型“两用系”转育过程中以加速转育进程。

根据大白菜雄性不育系定向转育模式，基因型为 Ms^fMs^f 的可育品系宜采用雄性不育系(*Msms*)作为不育源进行转育(李承彧, 2009)。转育包含两部分的连续回交工作，一部分是 $Ms^fMs\times Ms^fMs^f$，另一部分是 $Ms^fms\times Ms^fMs^f$，回交后代育性都表现为全可育。这两部分都需要通过测交鉴定基因型后再回交。如果分别利用与 *Ms* 和 *ms* 连锁的分子标记鉴定出含有 *Ms* 和 *ms* 的植株，可以省去测交环节，从而减少工作量并加快转育进程。本研究利用标记 syau-scr04 辅助 *Ms* 基因的选择，研究开发与 *ms* 基因紧密连锁的标记是今后亟待解决的一项任务。白菜类蔬菜作物种植广泛，在核基因雄性不育系转育过程中，利用分子标记技术在苗期对植株基因型进行鉴定，可大大加速转育进程，减少工作量。

本试验利用标记 syau-scr04 辅助目的基因 *Ms* 的选择，最终育成了分离比例为 1:1 的花心白菜‘宫古花蕊’Y02 甲型“两用系”。

3 试验材料与方法

3.1 亲本及不育源材料

不育源材料：白菜核不育系 06SX110(*Msms*)，“两用系”的不育株 06SX090(*MsMs*)。

转育目标品系：花心白菜‘宫古花蕊’Y02(Ms^fMs^f)。

3.2 用于辅助选择的标记

试验选择冯辉等(2009)开发的与不育基因 *Ms* 紧密连锁的 SCAR 共显性标记 syau-scr04，引物序列：5′−AGGATATATCTTGGCTCACGAG−3′，3′−CATCAATAGTGGCGTATGTCTG−5′，该标记距离 *Ms* 基因的遗传距离为 2.5 cM，退火温度为 58℃。

3.3 DNA 提取及 PCR 分析

DNA 提取采用的是改良 CTAB 法(Williamson et al., 1994)。PCR 分析方法，10 μL 体系：包括 6.6 μL 灭菌水，PCR 缓冲液(Mg^{2+})1 μL，2.5 mmol/L dNTPs 0.8 μmol，2.5U/μL *Taq* 聚合酶 0.1 μL，0.5 μmol/L 引物 1 μL，2 ng/μL DNA 0.5 μL。PCR 扩增程序为：预变性 5 min (94℃)，变性 1 min (94℃)，退火 1 min (58℃)，延伸 2 min (72℃)，循环 30 次，72℃延伸保持 5 min。

3.4 辅助选择转育路线

根据“核不育复等位基因遗传假说”(冯辉等, 1995; Feng et al., 1998)，基因型为 Ms^fMs^f 的待转育品系应以核不育系(*Msms*)为不育源，设计甲型“两用系”定向转育遗传模式(图 4)。通过与轮回亲本连续 4 代回交，实现基因型及植物学性状的同时转育，

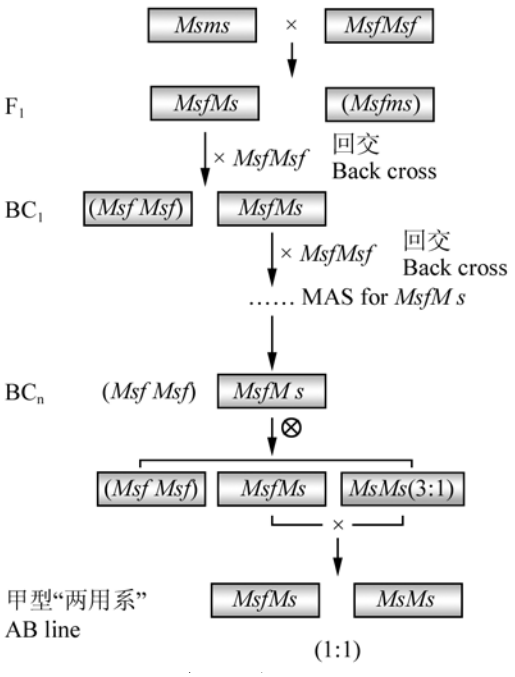

图 4 分子标记辅助选择转育白菜甲型“两用系”遗传模式

Figure 4 Genetic model for directional transfer of the multiple Allele inherited AB line type Ⅰ in Chinese Cabbage based on MAS

回交过程中会出现基因型不同的群体，表现型为可育，利用分子标记从群体中选择基因型为 Ms^fMs 的单株。选取基因型为 Ms^fMs 单株自交，自交后代兄妹交以获得甲型“两用系”。

样本容量按公式 $n \geq \lg(0.01) / \lg(1-p)$ 计算，p为目标个体出现概率；适合性测验取公式 $X^2_C = [\,|A - ra| - (r+1)/2\,]^2/r.n$。

作者贡献

杨宁、李跃飞和刘志勇是本研究的实验设计和实验研究的执行人；杨宁完成数据分析，论文初稿的写作；李跃飞和刘志勇参与实验设计，试验结果分析；冯辉是项目的构思者及负责人，指导实验设计，数据分析，论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31071792)和高等学校博士学科点专项科研基金(20092103110001)共同资助。作者感谢辽宁省十字花科蔬菜遗传育种重点实验室全体人员在本实验过程中给予的技术支持和有益建议。感谢两位匿名同行评审专家的评审建议和修改建议。

参考文献

Feng H., Wei P., Li C.Y., Choi S.R., Lin Y.P., and Piao Z.Y., 2009, Identification of SSR markers linked to *Ms*, a genic multiple-Allele male sterile gene in Chinese cabbage, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 36(1): 103-108 (冯辉, 魏鹏, 李承彧, 崔水莲, 林容杓, 朴钟云, 2009, 大白菜核基因雄性不育复等位基因 *Ms* 的 SSR 标记, 园艺学报, 36(1): 103-108)

Feng H., Wei Y.T., and Ji S.J., 1998, Multiple Allele model for genic male sterility in Chinese cabbage, Acta Hortic, 467: 133-142

Feng H., Wei Y.T., and Xu M., 1995, Genetic models for genic male sterile line of Chinese cabbage and its verification, The proceeding of horticulture of the secondly youth science annual meeting of China association for science and technology, Horticulture Dissertation, Beijing: Beijing, Agricultural University Press, pp.458-466

Feng H., Xu W., and Wang Y.G., 2007, Directive transfer of the genetic male sterile line of Milk Chinese cabbage AI023, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 34(3): 659-664 (冯辉, 徐巍, 王玉刚, 2007, ‘奶白菜 AI023’品系核基因雄性不育系的定向转育, 园艺学报, 34(3): 659-664)

Gao S.B., Carlos M., Debra J., Skinner A.F., Krivanek J.H., Crouch, and Xu Y.B., 2008, Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize, Mol. Breed., 22: 477-494

Liang F.S., Deng Q.Y., Wang Y.G., Xiong Y.D., Jin D.M., Li J.M., and Wang B., 2004, Molecular marker-assisted selection for yield-enhancing genes in the progeny of 9311×*O. rufipogon* using SSR, Euphytica, 139: 159-165

Liu Z.Y., Feng H., Li C.Y., Wei P., and Wang L.L., 2010, SCAR markers linked to *Ms*, a genetic male sterile gene in Chinese cabbage, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 37(5): 757-762 (刘志勇, 冯辉, 李承彧, 魏鹏, 王丽丽, 2010, 与大白菜雄性不育基因 *Ms* 连锁的 SCAR 标记, 园艺学报, 37(5): 757-762)

Sang X.C., Yang Z.L., Zhong B.Q., Li Y.F., Hou L., Pei Y., Li G.R., and He G.H., 2006, Assessment of purity of rice CMS lines using cpDNA marker, Euphytica, 152: 177-183

Shen X.Q., and Yang W.J., 2004, RAPD marker linked to the fertile restoring gene for the dominant genic male sterile lines in Chinese cabbage, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 31(6): 731 (沈向群, 杨文俊, 2004, 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, 31(6): 731)

Wang L.L., Wei P., Liu Z.Y., Li C.Y., Wang Y.G., Ji R.Q., and Feng H., 2010, Genetic male sterile line of Chinese cabbage developed by using molecular marker assisted selection, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 8(2): 322-328 (王丽丽, 魏鹏, 刘志勇, 李承彧, 王玉刚, 冀瑞琴, 冯辉, 2010, 利用分子标记辅助选育大白菜核基因雄性不育系, 分子植物育种, 8(2): 322-328)

Williamson V.M., Ho J.Y., Wu F.F., Miller N., and Kaloshian I., 1994, A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato, Theor. Appli. Genet., 87: 757-63

Xin B., Feng H., Yang X.F., and Wang Y.G., 2009, Studies on breeding for genetic male sterile line in *Brassica rapa* L. ssp. *Chinensis* L.. Zhongguo Shucai (China Vegetables), 14: 38-42 (辛彬, 冯辉, 杨晓飞, 王玉刚, 2009, 青梗菜核基因雄性不育系的转育, 中国蔬菜, 14: 38-2)

Yuan H., Zhang C.H., Liu H.H., Xuan S.X., Li X.F., and Shen S.X., 2009, Chromosomal location and AFLP marker screening of genic male sterile gene in Chinese cabbage, Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 45(6): 2061-2067 (袁鹤, 张成合, 刘海河, 轩淑欣, 李晓峰, 申书兴, 2009, 大白菜雄性核不育基因的染色体定位及 AFLP 分子标记筛选, 中国农业科学, 42(6):

2061-067)

Zhang S.J., Li F., Han H.P., Zhang S.F., Niu X.G., and Sun R.F., 2008, Molecular marker linked to a dominant genetic male sterile gene in Chinese cabbage [*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis* (Lour.) Olsson], Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 41(8): 2379-2385 (张淑江, 李菲, 韩和平, 章时蕃, 钮心恪, 孙日飞, 2008, 大白菜细胞核显性雄性不育基因连锁标记的筛选, 中国农业科学, 41(8): 2379-2385)

5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文，任何人都可以免费在线取阅您的论文

※同行评审，论文接受严格的高质量的评审
※在线发表，论文一经接受，即刻在线发表
※开放取阅，任何人都可免费取阅无限使用
※快捷搜索，涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
※论文版权，作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿：http://5th.sophiapublisher.com