

# 合成甘蓝型油菜中双隐性雄性核不育材料的发现及遗传规律分析

陈新<sup>1,2</sup>, 钱伟<sup>3</sup>, 曾长英<sup>2</sup>, 王文泉<sup>2\*</sup>, 孟金陵<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101; 3. 西南大学, 重庆 400715)

**摘要:** 从甘蓝型油菜与白菜型油菜的种间杂交获得的甘蓝型油菜(*Brassica napus*)中发现了雄性不育单株, 兄妹交株系和不育株与甘蓝型油菜常规杂交 F1 和 F2 株系的育性分离分析表明, 该不育材料属于双隐性雄性核不育类型。利用育性分离株系的可育株自交和可育株与不育株间兄妹交等方法筛选出 7 个纯合可育株系, 等位测验表明这 7 个纯合可育株系(B1~B7)中存在两种基因型: Ms1Ms1ms2ms2 和 ms1ms1Ms2Ms2。该材料对油菜核不育基因定位和杂种优势利用研究有重要意义。

**关键词:** 杂种优势; 种间杂交; 育性分离; 基因型

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)03-0321-05

## Finding and Genetic Analyzing of Double Recessive Genic Male Sterile Materials in Resynthesized *Brassica napus*

CHEN Xin<sup>1,2</sup>, QIAN Wei<sup>3</sup>, ZENG Chang-ying<sup>2</sup>, WANG Wen-quan<sup>2\*</sup>, MENG Jin-ling<sup>1\*</sup>

(1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou

571101, China; 3. School of Agronomy and Life Science, South West University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** A male sterile line of resynthesizing *Brassica napus* was discovered in the interspecific crossing between *Brassica napus* and *B. rapa*. The fertility segregation in brother-sister mating (BSM) lines and the hybrids F1, F2 lines from male sterile lines and *B. napus* cultivars were studied, which showed that the male sterile materials were double recessive genic male sterile. Using self-crossing and test crossing of different lines in fertility segregated lines, seven homozygous fertile lines (B1~B7) were screened out, and two genotypes (Ms1Ms1ms2ms2 and ms1ms1Ms2Ms2) were identified. These male sterile materials would play an important role in heterosis utilization and male sterile gene mapping.

**Key words:** Heterosis; Interspecific crossing; Fertility segregation; Genotype

杂种优势利用是提高农作物产量的重要途径, 随着杂种优势利用的不断深入, 其经济和社会效益日益突出, 各种农作物中雄性不育资源的发掘成了拓宽杂种优势利用的基础。现阶段油菜杂种优势利用主要集中于细胞质雄性不育, 而且不育基因资源大多局限于波里马和陕 2A 细胞质雄性不育<sup>[1-2]</sup>。

然而, 细胞质雄性不育的育性易受环境因素影响, 特别是遇低温会产生少量花粉, 导致杂种纯度下降<sup>[3]</sup>。为了解决细胞质雄性不育育性不稳定的问题, 由核基因控制的细胞核雄性不育研究受到关注。细胞核雄性不育不易受环境因素影响, 可以得到稳定的雄性不育性状。目前, 在油菜(*Brassica*

收稿日期: 2010-01-21 接受日期: 2010-03-12

基金项目: 教育部博士点基金项目(20020405009)资助

作者简介: 陈新(1978~), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事油菜遗传育种方面研究, email: chenxin3189@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Corresponding author, email: wenquanw@hainan.net; jmeng@mail.hzau.edu.cn

*napus*)中已发现一些自然突变的核不育材料,如显性核不育、隐性核不育、隐性上位核不育等<sup>[4-7]</sup>。本研究用甘蓝型油菜和白菜型油菜进行种间杂交获得的甘蓝型油菜,我们观察到雄性不育现象,且属于双隐性核不育类型。本文对其遗传规律进行了研究,以期对油菜核不育基因定位和杂种优势利用研究提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

天门油菜白(*Brassica rapa*, 白菜型油菜地方品种),华双 3 号(*Brassica napus*, 甘蓝型油菜双低品种)以及 24 个常规甘蓝型油菜品种(未列出)均采自华中农业大学油菜遗传育种研究室种质圃。

### 1.2 种间杂交及染色体观察

以华双 3 号为母本,天门油菜白为父本进行种间杂交得到 F<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> 再与天门油菜白回交得到 BC<sub>1</sub>, 采集 BC<sub>1</sub> 单株幼嫩花蕾,用卡诺溶液固定,根据 Li<sup>[8]</sup>的方法观察花粉母细胞,或柱头与花梗的体细胞染色体数目,每个样品观察 10~30 个分裂相,选择含有 38 条染色体的甘蓝型油菜单株。

### 1.3 雄性不育材料的发现与遗传分析流程

1999 年春以华双 3 号为母本,天门油菜白为父本配置杂种,同年夏繁与天门油菜白回交并收获 BC<sub>1</sub> 种子。2000 年春对 BC<sub>1</sub> 代植株进行染色体数目检测,选择染色体数目为 38 的植株套袋自交,并命名为 R<sub>1</sub>。2000 年夏繁和 2001 年春分别收获自交种子 R<sub>2</sub> 和 R<sub>3</sub>。2002 年春在 R<sub>3</sub> 群体的 2Q562-1-3 株系中发现不育株,且花药败育彻底;株系内兄妹交保持不育性并获得 R<sub>4</sub>-BSM 种子。2002 年夏繁,在育性分离的株系内继续兄妹交并收获 R<sub>5</sub>-BSM 种子。2003 年春,调查 35 个 R<sub>5</sub>-BSM 株系育性分离比,其中 4 个株系全可育;4 个株系育性分离比 1:1;3 个株系育性分离比为 3:1,其余 24 个株系有个别单株不育。从 4 个育性分离比为 1:1 和 3 个育性分离比为 3:1 的株系中分别随机选出 5 株和 12 株可育单株收获 17 份 R<sub>6</sub> 种子。2003 年夏繁,调查 17 个 R<sub>6</sub> 株系育性分离比,7 个株系 3:1 分离。7 个株系各选 6 株可育株收获 42 份 R<sub>7</sub> 自交种子,同时 42 个可育株/株系内不育株兄妹交收获 42 份 R<sub>7</sub>-BSM 种子。2004 年春,调查 42 个 R<sub>7</sub> 株系和 42 个 R<sub>7</sub>-BSM 株系育性分离比,得到 7 个

纯合可育株系 B<sub>1</sub>~B<sub>7</sub>(R<sub>7</sub>),并在 7 个纯合可育株间两两杂交,收获 F<sub>1</sub> 种子。2004 年夏繁,收获 7 份两两杂交 F<sub>1</sub> 的自交 F<sub>2</sub> 种子和 7 份两两杂交 F<sub>1</sub> 与不育株的杂交种子。2005 年春,调查 7 个两两杂交 F<sub>2</sub> 株系和 7 个两两杂交 F<sub>1</sub> 与不育株杂交种的育性分离比,得 B<sub>1</sub>~B<sub>7</sub> 株系基因型。

## 2 结果和分析

### 2.1 甘白种间杂种后代中新不育材料的发现

在 BC<sub>1</sub> 代选择含有 38 条染色体的单株,命名为 R<sub>1</sub> (因为是新合成甘蓝型油菜,故采用“Resynthesize”的第一个字母 R 来表示),并套袋自交得到 R<sub>2</sub> 代。对 R<sub>3</sub> 进行育性调查时,在来自同一个 R<sub>2</sub> 单株 2Q562-1-3 后代的自交群体中出现了花序发育正常,但雄蕊彻底败育的一些单株。不育株在蕾期遇低温花序上发生死蕾现象,而且花蕾的饱满度明显低于可育株。不育株花蕾发育初期花丝上可见雄蕊,但随着花苞的逐渐长大雄蕊逐渐萎缩变小直至干枯变黄。开花后雄蕊无花粉散出,败育十分彻底。

### 2.2 兄妹交株系育性分离调查

R<sub>3</sub> 中存在不育株的株系,进行株系内兄妹交保持不育性。在育性存在分离的兄妹交株系内连续兄妹交,并于 2003 年春对 35 个 R<sub>5</sub>-BSM 株系进行育性分离比的调查。4 个 R<sub>5</sub>-BSM 株系全为可育株,4 个 R<sub>5</sub>-BSM 株系的可育株与不育株分离比为 1:1,另有 3 个 R<sub>5</sub>-BSM 株系的可育株与不育株分离比 3:1(表 1),其余 24 个 R<sub>5</sub>-BSM 株系仅有个别单株不育。根据育性调查结果,初步判断该不育性状可能为核基因控制。

表 1 11 个 R<sub>5</sub>-BSM 株系的育性分离比

Table 1 The fertility and sterility segregate ratio in 11 R<sub>5</sub>-BSM lines

株系 Lines	可育株 Fertile	不育株 Sterile	$\chi^2_{(0.05)}$
R5-BSM-1(A1)	59	0	/
R5-BSM-2(A2)	61	0	/
R5-BSM-3(A3)	65	0	/
R5-BSM-4(A4)	71	0	/
R5-BSM-5(A5)	17	17	0 (1:1)
R5-BSM-6(A6)	10	11	0.048 (1:1)
R5-BSM-7(A7)	43	52	0.994 (1:1)
R5-BSM-8(A8)	54	55	0.009 (1:1)
R5-BSM-9(A9)	88	23	1.084 (3:1)
R5-BSM-10(A10)	129	49	0.609 (3:1)
R5-BSM-11(A12)	107	37	0.036 (3:1)

$\chi^2 < 3.84$  表示符合 1:1 和 3:1 的比例。 $\chi^2 < 3.84$  means that it fits to the ratio of 1:1 and 3:1. 下表同。The same as following Tables.

### 2.3 核不育类型的确定

为了确定该不育材料的类型,本研究选用24个甘蓝型油菜商业常规品种与不育株配制的杂种F1,并获得部分杂种F1的F2代种子。调查24个杂种F1株系的育性分离比,发现这24个常规甘蓝型油菜与不育株的杂种F1株系全部可育,据此推测可能为隐性核不育类型。若为显性核不育,恢复系不会如此的广泛<sup>[5]</sup>。从24个杂种F1中随机挑取3个不同组合的F1单株套袋自交,调查3个F2株系育性分离比,可育株/不育株的分离比均为15:1(可育株/不育株分别为158/10,  $x^2 = 0.046$ ; 172/9,  $x^2 = 0.499$ ; 140/7,  $x^2 = 0.726$ )。

另外,从2Q562-R1的姊妹株系中选出2Q542-R2株系,连续自交得到2Q542-R5(在繁殖过程中从未出现不育株)与不育株杂交,其F1全可育,F2育性分离比满足15:1(可育株/不育株 = 119/6,  $x^2 = 0.448$ ),说明该不育材料的育性是由2对基因控制,不育株(来自2Q562-R2)的基因型为ms1ms1ms2ms2,可育株(来自2Q542-R5)的基因型为Ms1Ms1Ms2Ms2,二者杂交F1的基因型为Ms1ms1Ms2ms2,表现为全可育,F2株系育性分离为15[可育(9 Ms1\_Ms2\_ + 3 Ms1\_ms2ms2 + 3 ms1ms1Ms2\_)]:1[不育(ms1ms1ms2ms2)]。因此,该不育材料属于双隐性核不育类型。

### 2.4 纯合可育株的筛选

调查35个R5-BSM株系的育性分离时,有4个株系的可育株/不育株分离比为1:1,有3个株系为3:1。育性分离比为1:1的4个株系中,可育株的基因型为Ms1ms1ms2ms2或ms1ms1Ms2ms2;育性分离比为3:1的3个株系中,可育株的基因型为Ms1ms1ms2ms2、ms1ms1Ms2ms2或Ms1ms1Ms2ms2。因此,可以从基因型为Ms1ms1ms2ms2和ms1ms1Ms2ms2的可育株自交子代中筛选出基因型为Ms1Ms1ms2ms2和ms1ms1Ms2Ms2的纯合可育株。

为了得到基因型为Ms1Ms1ms2ms2和ms1ms1Ms2Ms2的可育株,从育性分离比符合1:1和3:1的R5-BSM株系中分别选出5个和12个可育株自交,收获17份自交种子。同年6月夏繁种于田间,调查这17个株系的育性分离状况,其中7个株系符合3:1的育性分离(表2)。

表2 7个株系的育性分离情况

Table 2 The fertility and sterility segregation in 7 lines

株系 Lines	可育株 Fertile	不育株 Sterile	$x^2_{(0.05)}$
R6-A5	13	5	0.074 (3:1)
R6-A6	35	11	0.029 (3:1)
R6-A7	33	11	0 (3:1)
R6-A9-1	14	4	0.074 (3:1)
R6-A9-2	20	5	0.336 (3:1)
R6-A9-3	19	4	0.711 (3:1)
R6-A10	18	6	0 (3:1)

在7个育性分离符合3:1的株系中,每个株系随机选取6株可育株套袋自交,并与株系内的不育株进行兄妹交,以考察可育株基因型是否纯合。在42个可育株自交后代中,除R7-A10中只有1个株系全可育外,其余6个株系都有2个株系全可育,与理论值基本相符。而且这13个可育株与不育株的兄妹交株系也全部可育,表明R6代的这13个可育单株的育性基因纯合(表3)。其余29个自交株系和29个自交系与不育株的兄妹交株系育性分离为3:1和1:1(数据未列出),说明R6代的这29单株育性基因为杂合。

表3 13个纯合可育株系的育性分离调查

Table 3 The fertility segregation in 13 homozygous fertile lines

株系 Lines	R7自交系(可育株/不育株) R7 self-crossing line (Fertile /Sterile)	R7-BSM株系(可育株/不育株) R7-BSM line (Fertile /Sterile)
R7-A9-1(B1)	26/0	39/0
R7-A9-2	13/0	6/0
R7-A9-3(B2)	73/0	56/0
R7-A9-4	58/0	37/0
R7-A9-5(B3)	31/0	32/0
R7-A9-6	38/0	26/0
R7-A10(B4)	21/0	32/0
R7-A5-1(B5)	72/0	15/0
R7-A5-2	48/0	11/0
R7-A6-1(B6)	85/0	63/0
R7-A6-2	7/0	35/0
R7-A7-1(B7)	62/0	49/0
R7-A7-2	30/0	60/0

### 2.5 纯合可育株间的基因等位性测验

根据13个纯合可育株系的系谱,R7-A9在R5代是育性分离比为3:1的BSM株系,其R7代可能包含Ms1和Ms2基因。选取3个R7-A9株系,另选取4个来源于育性分离比为1:1的BSM株系,

共 7 个株系,分别命名为 B1~B7(表 3)。根据花期的早晚,按图 1 方式两两杂交,调查两两杂交 F2 代,及两两杂交 F1 与不育株杂交所得株系的育性分离比(表 4)。

从调查数据可以得出, B7 × B2 和 B2 × B5 的 F2 株系育性分离比符合 15:1,对应的 F1 与不育株的杂交株系育性分离比符合 3:1。由此可知, B2 中控制不育性状的基因与 B5 和 B7 是不等位的,若假定 B2 的基因型是 Ms1Ms1ms2ms2,则 B5 和 B7 的基因型应该是 ms1ms1Ms2Ms2。另外,其它的 F2

株系和 F1 与不育株的杂交株系均未出现育性分离,由此推测 B1、B3、B4 和 B6 的基因型也为 ms1ms1Ms2Ms2。

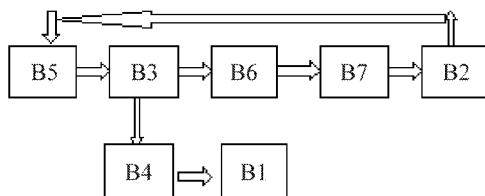


图 1 7 个纯合可育株系两两杂交示意图

Fig. 1 Sketch map of mutual cross among seven homozygous fertile lines

表 4 7 个两两杂交 F2 和 7 个两两杂交 F1 × 不育株的育性分离调查

Table 4 The fertility segregation in seven mutual-F2 lines and seven mutual-F1 × male sterile line

杂交组合 Combinations	两两杂交 F2 (可育株/ 不育株) Mutual-F2 (Fertile /Sterile)	$\chi^2_{(0.05)}$	两两杂交 F1 × 不育株(可育株/ 不育株) Mutual-F1 × male sterile lines (Fertile /Sterile)	$\chi^2_{(0.05)}$
B3 × B6	89/0	/	72/0	/
B6 × B7	79/0	/	81/0	/
B7 × B2	279/14	1.083 (15: 1)	208/67	0.059 (3: 1)
B2 × B5	154/5	2.616 (15: 1)	110/30	0.952 (3: 1)
B5 × B3	87/0	/	173/0	/
B3 × B4	68/0	/	140/0	/
B4 × B1	89/0	/	80/0	/

$\chi^2 < 3.84$  表示符合 15:1 和 3:1 的比例。  $\chi^2 < 3.84$  means that it fits to the ratio of 15:1 and 3:1.

## 3 讨论

### 3.1 双隐性雄性核不育类型的确定

杂种优势利用是提高农作物产量的有效途径,发掘与拓展不育基因资源是利用杂种优势的重要基础。自然界存在的不育资源有限,育种工作者通过各种手段创造新的不育材料,期望能服务于生产。本实验通过甘蓝型油菜与白菜型油菜种间杂交得到甘蓝型油菜,发现核不育现象,通过株系内兄妹交保持不育性状。另外,通过调查其与甘蓝型油菜常规品种杂交后代和兄妹交株系育性分离比,结合已知核不育类型的遗传规律,推断该不育材料为双隐性核不育类型。目前,我国油菜双隐性核不育材料的育种和杂种优势利用主要集中在贵州省,而且油研系列和黔油系列中的部分品种是以双隐性核不育两型系为母本,制种时需拔除一半的可育株而育成,生产上也有较大推广<sup>[9-10]</sup>。

本研究发现的隐性核不育材料与已知的两种隐性核不育材料 117AB 和 S45AB 相比,不育基因是否相同,还有待与 117AB 和 S45AB 进行等位性测验。目前, Yi 等<sup>[11]</sup>和 Lei 等<sup>[12]</sup>已将 S45AB 的 2 个

不育基因分别定位在甘蓝型油菜的 N7 和 N16 连锁群上,而且开发了与之紧密连锁的 SCAR 标记,遗传距离均小于 0.75 cM。Ke 等<sup>[13]</sup>找到与 117AB 的 1 个不育基因紧密连锁的 SCAR 标记,遗传距离小于 8.0 cM。对本研究发现的核不育材料,急需从两个方面开展工作:(1)通过分子生物学实验,确定不育基因是否和已知的与不育基因紧密连锁的 SCAR 标记连锁,连锁程度如何;(2)通过杂交试验,检测其是否与 117AB 和 S45AB 等位。

### 3.2 双隐性雄性核不育基因定位的构想

如果通过进一步实验发现,该不育类型的不育基因与 S45AB 和 117AB 不等位,或仅与 117AB 不等位,那么根据我们获得的实验材料,可设计后续实验进行不育基因的定位与克隆。B2 和 B3 来源于 R5-A9,遗传背景基本相同,仅在育性基因位点存在差异。另外,本实验从 R5-A9 中分离出一些育性分离比为 1:1 的株系,并在株系内连续兄妹交 4 代,得到遗传背景高度一致的 R9-A9AB 株系。因此, B2、B3 和 R9-A9AB 这 3 个株系可视为近等位基因系。利用 B2 和 B3,以及 R9-A9AB 中的不育株可

构建3个不育基因定位群体。首先利用B2和B3分别与R9-A9AB中的不育株构建只有一个育性基因存在差异且育性分离比为1:1的第1和第2定位群体;其次利用B2与B3的F2群体构建一个包含2个育性基因且育性分离比为15:1的第3定位群体。前2个定位群体可以分别对 $ms1$ 和 $ms2$ 进行定位,第3定位群体则同时对 $ms1$ 和 $ms2$ 进行定位。这样3个实验结果可以相互印证,预期可以找到与不育基因紧密连锁或共分离的分子标记,为核不育基因的分子标记辅助筛选和克隆提供帮助。

### 参考文献

- [1] 傅廷栋, 杨光圣. 油菜细胞质雄性不育研究进展 [J]. 农牧情报研究, 1989, 11: 1-8.
- [2] Yang G S(杨光圣), Fu T D(傅廷栋). Studies on the Shan 2A cytoplasmic male sterility of *Brassica napus* L. [J]. J Huazhong Agri Univ(华中农业大学学报), 1990, 9(2): 141-147.(in Chinese)
- [3] Jiang L C(蒋梁材), Wang R(王瑞), Pu X B(蒲晓斌), et al. A preliminary report of the breeding of a dominant genic + cytoplasmic male sterile line in rapeseed (*Brassica napus*) [J]. J SW Agri Univ(西南农业大学学报), 1999, 21(6): 522-524.(in Chinese)
- [4] Tu J X(涂金星), Fu T D(傅廷栋), Zheng Y L(郑用琏). Analysis on inheritance and isocus of the rapeseed GMS 90-2441A (*B. napus*) [J]. J Huazhong Agri Univ(华中农业大学学报), 1997, 16(3): 255-258.(in Chinese)
- [5] Li S L(李树林), Zhou X R(周熙荣), Zhou Z J(周志疆), et al. Inheritance of genetic male sterility (GMS) and its utilization in rape (*Brassica napus* L.) [J]. Crop Res(作物研究), 1990, 4(3): 27-32.(in Chinese)
- [6] Chen F X(陈凤祥), Hu B C(胡宝成). Comparative study on hereditability among three rapeseed GMS lines [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 1998, 26(3): 192-194.(in Chinese)
- [7] Chen F X(陈凤祥), Hu B C(胡宝成), Li Q S(李强生), et al. The breeding of the recessive epistatically genic male sterile hybrid rapeseed Wanyou 18 with double low [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2002, 30(4): 535-537.(in Chinese)
- [8] Li Z Y. Production and cytogenetics of the intergeneric hybrids *Brassica juncea* × *Orychophragmus violaceus* and *Brassica carinata* × *Orychophragmus violaceus* [J]. Theor Appl Genet, 1998, 98: 251-261.
- [9] Zeng Z L(曾章丽), Chen D L(陈大伦), Zhang M R(张瑞茂), et al. The relationship between purity and F1 yield of rape hybrid with recessive genic male sterile two-line in *Brassica napus* [J]. Guizhou Agri Sci(贵州农业科学), 2007, 35(2): 34-35.(in Chinese)
- [10] Li D X(李大雄). Breeding of Qianyou 29, a new hybrid rape variety with high yield and double-low content [J]. Guizhou Agri Sci(贵州农业科学), 2009, 37(7): 10-12.(in Chinese)
- [11] Yi B, Chen Y N, Lei S L, et al. Fine mapping of the recessive genic male-sterile gene (*Bnms1*) in *Brassica napus* L. [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113: 643-650.
- [12] Lei S L, Yao X Q, Yi B, et al. Towards map-based cloning: fine mapping of a recessive genic male-sterile gene (*Bnms2*) in *Brassica napus* L. and syntenic region identification based on the *Arabidopsis thaliana* genome sequences [J]. Theor Appl genet, 2007, 115: 643-651.
- [13] Ke L P, Sun Y Q, Liu P W, et al. Identification of AFLP fragments linked to one recessive genic male sterility (RGMS) in rapeseed (*Brassica napus* L.) and conversion to SCAR markers for marker-aided selection [J]. Euphytica, 2004, 138: 163-168.