

甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系的筛选和初步研究

文雁成,张书芬,王建平,朱家成,赵磊,曹金华

(河南省农业科学院 经济作物研究所,河南 郑州 450002)

摘要: 为了选育甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系,并将该雄性不育系统杂交种投入生产应用,通过10多年自交和测交,从甘蓝型油菜萝卜质雄性不育掺合型杂交种 Corrida 中筛选出了萝卜质雄性不育恢复系 R2008。R2008 在不同年份均能使萝卜质雄性不育系完全恢复育性,从而实现了萝卜质雄性不育系、保持系和恢复系三系配套。遗传分析表明,R2008 的恢复性状受一对显性基因控制。其中萝卜质雄性不育系的基因型为 $S(rr)$,恢复系的基因型为 (RR) ,现有的甘蓝型油菜均为萝卜质雄性不育系的保持系,基因型均为 $N(rr)$ 。与当地甘蓝型油菜相比,R2008 生育期长(240 d)、芥酸和硫甙含量高(分别为 12.93% 和 78.63 $\mu\text{mol/g}$)、结角率低(74.89%)、角粒数少(10.69 粒)、冻害重(冻害率 100%,冻害指数 73.50)。要选育合格的甘蓝型油菜萝卜质雄性不育杂交种应用于生产,必须对 R2008 的上述性状进行改良。

关键词: 甘蓝型油菜;萝卜质雄性不育系;恢复系;遗传

中图分类号: S565.403 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0102-05

Screening and Preliminary Studies of Restorers of Radish Cytoplasmic Male Sterile Lines in *Brassica napus* L.

WEN Yan-cheng, ZHANG Shu-fen, WANG Jian-ping, ZHU Jia-cheng, ZHAO Lei, CAO Jin-hua

(Institute of Industrial Crops, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to obtain restorers of radish cytoplasmic male sterile lines in *Brassica napus* and breed radish cytoplasmic male sterile (RCMS) hybrids for rapeseed production, restorer R2008 of RCMS lines was screened from Corrida after self pollinations and testcrosses for more than 10 years. Corrida was mixture of RCMS hybrid without pollen and pollen supplier line. R2008 could restore the fertility of RCMS lines in different years. Therefore, sterile line, maintainers and restorers of RCMS were obtained. The genetic studies indicated that the restorer was controlled by one dominant gene. The genotype of RCMS lines was $S(rr)$, restorer line was (RR) and maintainer line was $N(rr)$. All present *Brassica napus* lines were maintainers of RCMS lines. Compared with local rapeseed varieties, R2008 has longer growth period (240 days), higher erucic acid content (12.93%), higher glucosinolates content (78.63 $\mu\text{mol/g}$), lower silique-bearing percentage (74.89%) and more serious cold injury (cold injury rate was 100% and cold injury index was 73.5). All agronomic characters of R2008 must be improved before qualified RCMS hybrids are put into rapeseed production.

Key words: *Brassica napus* L.; Radish cytoplasmic male sterile line; Restorer; Genetics

油菜杂种优势利用是大幅度提高油菜产量的有效途径^[1]。油菜杂种优势利用途径很多,我国生产上大量应用的主要有胞质不育和核不育杂交种系统^[2,3]。这两种杂种优势利用途径各有优缺点。核不育系不育性彻底稳定,不受环境条件影响,恢复系多,易获得强优势组合。该系统的不足之处在于其

不育系中存在 50% 可育株,在亲本繁殖和杂交种生产中要人工去除不育系中 50% 的可育株,导致生产成本增加,而且一旦去除不及时,杂交种中会出现一定比例的不育株^[4,5]。胞质不育系统克服了核不育系群体中存在 50% 不育株的难题,实现了不育系、保持系和恢复系三系配套,解决了亲本繁殖和杂交种生产

收稿日期: 2010-06-27

基金项目: 国家“863”项目油菜杂种优势利用专项(2009AA101105); 国家油菜产业技术体系项目(nycytx-005)

作者简介: 文雁成(1965-),男,河南光山人,副研究员,在读博士,主要从事油菜遗传育种研究。

中人工去除不育系中多达 50% 可育株的难题。但是该系统也有其缺陷, 即其不育系的不育性不够彻底、受环境温度的影响, 在一定温度条件下存在微量花粉^[6-10]。这一特性导致胞质不育杂交种中总是存在一定比例的不育株, 使得杂种优势不能充分表现。因此人们试图找到既能三系配套、不育系不育性又彻底稳定的杂种优势利用新途径。萝卜质雄性不育系不育性稳定彻底, 但是长期以来, 该不育系叶片缺绿, 现有的甘蓝型油菜品系均为其保持系, 找不到恢复系, 致使其研究和应用停滞不前^[11-13]。

Pelletier 等^[14]通过细胞质融合将萝卜中的恢复基因转移到甘蓝型油菜中, 解决了甘蓝型油菜萝卜质雄性不育系叶片缺绿和找不到恢复系的世界性难题, 实现了萝卜质雄性不育系、保持系和恢复系三系配套, 使得该不育系统能够应用于油菜生产。但是, 在我国, 甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系一直没能找到, 导致该系统不能投入生产应用。本课题组经过多年研究, 从引进的油菜种质资源材料中筛选出了萝卜质雄性不育性恢复材料, 并对其特性进行了研究, 旨在解决现有核不育系统杂交种和胞质不育系统杂交种生产中存在的问题。

1 材料和方法

1.1 材料

1997 年秋季从比利时引进 21 个欧洲甘蓝型油菜品种, 其中常规种 14 个 (Akamar、Ark、Capital、Libravo、Samourai、Amber、Apex、Alaska、Alpine、Kansas、Corniche、Contact、Bristol、Colombus)、法国萝卜质雄性不育掺合型杂交种 5 个 (Synergy、Cannon、Cocktail、Corrida 和 Everest)、德国 Lembke MSL (Male sterile line) 系统杂交种 2 个 (Joker 和 Pronto)。从上述品种中的可育材料中筛选萝卜质雄性不育恢复系。用中油 821 和中双 4 号为保持系转育萝卜质雄性不育系, 用双油 9 号作对照考察筛选的恢复系的性状。

1.2 方法

将引进的 21 个欧洲油菜品种种子各分成两份, 分别于 1997 年和 1998 年播种于河南省农业科学院试验田 (郑州), 于花期调查各品种育性。1998 年 4 月花期, 用引进的育性正常的品种以及掺合型杂交种中的可育单株与萝卜质雄性不育株成对测交, 1999 年花期调查 F_1 的育性恢复情况。对 F_1 群体出现恢复单株的组合, 将其父本自交纯合, 并连续测交, 直至 2004 年测交后代 100% 恢复, 即得到纯合的萝卜质雄性不育恢复系 R2008。从 2005 年到

2009 年考察 R2008 不育性恢复的稳定性。

通过 F_1 自交、 F_1 作父本与萝卜质雄性不育系作母本回交, 调查后代群体育性分离情况, 从而研究恢复基因的遗传规律。同时用中油 821 和中双 4 号作保持系保存和改良萝卜质雄性不育系。参照文献 [15] 对调查结果进行适合性 χ^2 测验, 确定萝卜质雄性不育恢复性状的遗传规律。所用 χ^2 测验公式为: $\chi^2 = \sum \frac{(|O - E| - 0.5)^2}{E}$, $df = 1$ 。式中 O 为观察值, E 为期望值。

2007 年秋至 2008 年 5 月生长季, 用本单位选育的甘蓝型双低常规品种双油 9 号作对照, 考察萝卜质雄性不育恢复系的生育期、抗寒性、种子芥酸含量、硫甙含量、结实率和角果粒数等性状, 调查标准按照刘后利^[16]标准。利用 FOSS 公司近红外品质分析仪测定 10 个自交单株的芥酸和硫甙含量。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系的筛选

1998 年和 1999 年 4 月油菜花期进行育性调查时发现, 14 个常规种和 2 个德国 Lembke MSL 系统杂交种育性均为正常。1998 年在 Synergy、Cannon、Cocktail、Corrida 和 Everest 5 个萝卜质雄性不育掺合型杂交种中分别发现 11、2、2、5、6 株正常可育株。1999 年在 Synergy、Cocktail、Corrida 和 Everest 4 个萝卜质雄性不育掺合型杂交种 (Cannon 在该年度未出苗) 中, 分别发现 14、3、7 和 6 株恢复单株。2 年各品种中可育株与不育株比例基本相同, 说明这些掺合型杂交种中的可育单株来自这些品种, 而不是田间杂株。而且欧洲油菜叶色深、生育期晚, 农艺性状与本地油菜有明显区别, 这也可以说明这些可育单株来自这些品种, 不是田间实生苗 (表 1)。1998 年花期利用这些引进品种中的可育品种和掺合型杂交种内可育株与萝卜质雄性不育株测交。1999 年花期, 发现 Corrida 中的不育株与可育株测交后代发生育性分离, 其中 18 株可育株和 25 株不育株, 说明 Corrida 中的可育株为含有萝卜质雄性不育恢复基因的杂合型单株。其他可育品种和掺合型杂交种可育株与萝卜质雄性不育株测交后代 100% 为萝卜质雄性不育, 说明这些常规品种和掺合型杂交种中的正常可育株不含萝卜质雄性不育性恢复基因 (表 2)。经过连续 6 年自交和成对测交, 筛选出了能够使萝卜质雄性不育系 100% 恢复育性的恢复系, 命名为 R2008。用 R2008 与萝卜质雄性不育系测交, 检验该品系的恢复能力在不同年份的变化。结果表

明,R2008 在 2005 – 2009 年连续 6 年均能使所有 51 个组合的 2 256 个 F_1 单株完全恢复育性,说明 R2008 的恢复能力是稳定的,不受环境条件的影响 (表 3)。

表 1 引进的 5 个萝卜质雄性不育掺合型杂交种的育性表现

Tab. 1 The fertility results of five introduced radish cytoplasmic male sterile mixture hybrids

年份 Year	育性 Fertility	Synergy	Cannon	Cocktail	Corrida	Everest
1998	可育株数/株 No. of fertile plants	11	2	2	5	6
	不育株数/株 No. of sterile plants	40	45	45	22	31
	可育株数/总株数/%	21.6	4.3	4.3	18.5	16.2
	Ratio of fertile plants in total plants/%					
1999	可育株数/株 No. of fertile plants	14	–	3	7	6
	不育株数/株 No. of sterile plants	46	–	51	31	33
	可育株数/总株数/%	23.3	–	5.5	18.4	15.4
	Ratio of fertile plants in total plants/%					

表 2 可育品种和掺合型杂交种中可育单株与萝卜质雄性不育株测交后代育性表现

Tab. 2 The fertility results of F_1 progeny crossed between RCMS lines and fertile cultivars and fertile plants in introduced RCMS mixture hybrids

组合 Combination	可育株数/株 Fertile plants	不育株数/株 Sterile plants	可育株比例/% Ratio of fertile plants in total plants
萝卜质不育系 × 中油 821	0	43	0
萝卜质不育系 × Joker	0	41	0
萝卜质不育系 × Synergy 中的可育株	0	44	0
萝卜质不育系 × Corrida 中的可育株	18	25	41.86
萝卜质不育系 × Everest 中的可育株	0	43	0
萝卜质不育系 × Cocktail 中的可育株	0	45	0
萝卜质不育系 × 中双 4 号	0	40	0

表 3 R2008 在不同年份与萝卜质雄性质不育系测交后代育性表现

Table 3 The fertility results of F_1 progeny crossed between RCMS lines and R2008 in different years

年份 Year	组合数 No. of combinations	可育株数/株 Fertile plants	不育株数/株 Sterile plants	可育株比例/% Ratio of fertile plants in total plants
2005	4	173	0	100
2006	7	305	0	100
2007	13	517	0	100
2008	15	719	0	100
2009	12	542	0	100

2.2 甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系的遗传特性
R2008 与萝卜质雄性不育系杂交种的 F_2 群体中,正常可育株 138 株,萝卜质雄性不育株 48 株。适合性测验结果 $\chi^2 = 0.0287$,小于 $\chi^2_{0.05} = 3.84$,可育株与不育株比例符合 3:1 的分离比例。R2008 与萝卜质雄性不育系杂交种 F_1 与萝卜质雄性不育系回交后代中,正常可育株 73 株,萝卜质雄性不育株 76 株。适合性测验结果 $\chi^2 = 0.0269$,小于 $\chi^2_{0.05} = 3.84$,可育株与不育株比例符合 1:1 的分离比例。上述结果表明,萝卜质雄性不育恢复系由一对基因控制,可育对不育为显性。在用 R2008 与中双 4 号

杂交所得的 F_1 与萝卜质雄性不育系杂交的后代中,正常可育株 87 株,萝卜质雄性不育株 82 株,适合性测验表明 $\chi^2 = 0.0946$,小于 $\chi^2_{0.05} = 3.84$,可育株与不育株比例适合 1:1 的分离比例,这个结果进一步验证了上述结论 (表 4)。据此可以得出结论, R2008 的恢复基因型为? (RR),萝卜质雄性不育系的基因型为 S (rr),现有的甘蓝型油菜均为其保持系,基因型为 N (rr)。其中 R 表示萝卜质恢复基因, r 为萝卜质雄性不育基因, S 为不育萝卜细胞质, N 为可育萝卜细胞质, ? 表示其细胞质的育性类型可为 N 或 S。

表 4 R2008 与萝卜质雄性不育系杂交后代 F_2 育性及其与萝卜质雄性不育系回交后代育性表现

Tab. 4 The fertility results of F_2 of R2008 crossing with RCMS lines and F_1 backcrossing with RCMS sterile lines

组合 Combination	可育株数/株 Fertile plants	不育株数/株 Sterile plants	可育株占总株数比例/% Ratio of fertile plants in total plants	χ^2_c	
				1:1	3:1
(萝卜质不育系 × R2008) F_2	138	48	74.19	–	0.0287
萝卜质不育系 × (萝卜质不育系 × R2008) F_1	73	76	48.99	0.0269	–
萝卜质不育系 × (R2008 × 中双 4 号)	87	82	51.48	0.0946	–

注: $\chi^2_{0.05} = 3.84$ 。

2.3 萝卜质雄性不育恢复系 R2008 的性状表现

由表 5 可以看出, R2008 与当地甘蓝型油菜在生育期、品质性状、结实性和抗寒能力等方面存在显著差异。其中, 该品系生育期较当地甘蓝型油菜普遍偏长。抗寒性也较本地油菜差, 冻害率为 100%, 冻害指数达到 73.5。上述特性与其他引进的欧洲油菜品种特性一致。该品系的芥酸含量 12.93%, 硫甙含量为 78.63 $\mu\text{mol/g}$, 属中芥酸、中硫甙品系。而且该品系的天然结角率和角果粒数都较低, 分别为 74.89% 和 10.69 粒, 均比常规双低油菜品种双油 9 号低。

表 5 当地甘蓝型油菜品种与萝卜质

雄性不育恢复系农艺性状比较

Tab. 5 Comparision of agronomic characters between local cultivar and RCMS restorer R2008

性状 Characters	R2008	双油 9 号 Shuangyou No. 9
生育期/d Growth period	240	231
冻害率/% Cold injury rate	100	83.60
冻害指数 Cold injury index	73.50	24.90
芥酸含量/% Erucic acid content	12.93	0.05
硫甙含量/($\mu\text{mol/g}$) Glucosinolates content	78.63	23.70
结角率/% Silique-bearing percentage	74.89	82.65
角粒数/粒 No. of seeds per silique	10.69	19.61

3 讨论

与其他作物相比, 油菜具有明显杂种优势, 油菜杂交种已经在生产上普遍应用^[1]。目前油菜杂交种生产中有很多授粉控制系统, 包括胞质不育系统、核不育系统、自交不亲和系统和化学杀雄系统。这些系统虽然能够满足油菜杂交种生产的需要, 但是各有优缺点, 都不够十分完善。寻求不育性更为稳定、彻底、配合力高、亲本繁殖和杂交种生产田间操作简单、制种产量高、制种成本低的授粉控制系统一直是油菜育种者研究的重点课题。虽然经过多年研究大幅度降低了胞质不育系统的微量花粉量, 但是微量花粉、杂交种细胞质单一和恢复系少仍然是该系统存在的主要问题^[6-10]。核不育系统类型较多, 有隐性核不育、显性核不育和生态型核不育等, 经过改进, 人们育成了隐性和显性核不育三系, 解决了核不育亲本繁殖和杂交种制种过程中需要拔除 50% 可育株的难题。但是该系统存在保持系较少、亲本选育较难的问题^[17-19]。杨光圣等^[19]为了减少 pol 胞质不育微量花粉, 将胞质不育与核不育相结合, 使胞质不育的微量花粉减少 50%, 但还没有彻底解决胞质不育的微量花粉问题。自交不亲和系统虽经过多年研究, 在生产上还没有大面积应用^[1]。化学杀

雄系统杂交种由于易受外界条件影响、田间操作繁琐, 也没有在生产上大面积应用。

甘蓝型油菜萝卜质雄性不育系统是对目前已经应用的油菜授粉控制系统的改进, 也是一个重要的补充。该系统不育性彻底、稳定、三系配套, 集中了胞质不育系统的优点, 克服了核不育系统和胞质不育系统的缺点。但是, 由于甘蓝型油菜萝卜质雄性不育性恢复基因来自与甘蓝型油菜亲缘关系较远的萝卜, 存在一些需要改进的遗传缺陷, 如恢复系结实性差、角粒数少等。在甘蓝型油菜萝卜质雄性不育性恢复系的遗传研究中, Deloure 等^[21]发现恢复性不仅受一对显性基因控制, 也受多对基因控制, 只是通过多代自交改良, 多基因控制的恢复基因才减少稳定为一对基因控制。本文作者的研究验证了上述结论。从多年对甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系改良的实践和法国专家 Deloure 等^[22]研究可以看出, 恢复基因与高硫甙基因连锁程度较高, 选育低硫甙萝卜质雄性不育恢复系较为困难。由于甘蓝型油菜萝卜质雄性不育性恢复系来自欧洲品种, 带有明显的欧洲油菜特性, 在北方冬油菜区抗寒能力较差, 生育期长。要使甘蓝型油菜萝卜质雄性不育系统应用于我国油菜生产, 必须首先解决恢复系硫甙含量高、抗寒能力差和生育期长的问题。其次也要解决恢复系结实性差的问题, 降低制种成本。从 Deloure 等^[19-20]研究可以看出, 恢复系硫甙含量高和恢复系结实性差的问题是可以改进的。

综上所述, R2008 为经过多年自交、测交筛选得到的甘蓝型油菜萝卜质雄性不育恢复系, 由一对显性基因控制, 可育对不育为显性。R2008 的恢复基因型为? (RR), 不育系的基因型为 S (rr), 保持系的基因型为 N (rr)。R2008 的筛选实现了甘蓝型油菜萝卜质雄性不育系、保持系和恢复系三系配套, 使得该系统能够成功地应用于油菜生产。但是, 目前 R2008 还存在生育期较长、抗寒性较差、硫甙含量高、芥酸含量偏高、结实性差等缺陷, 需要进行改良。

参考文献:

- [1] 傅廷栋. 杂交油菜的育种和利用 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1995: 42-83.
- [2] 张书芬, 文雁成, 王建平, 等. 河南省优质油菜杂种优势利用研究进展 [J]. 河南农业科学, 2005(7): 9-12.
- [3] 田保明, 王建平, 文雁成, 等. 甘蓝型油菜胞质雄性不育系 CMS22A 的选育与遗传 I. 双低不育系 CMS22A 的选育及其败育类型研究 [J]. 河南农业科学, 2005(2): 22-24.
- [4] 侯国佐, 王 华, 张瑞茂. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育

- 材料 117A 的遗传研究[J]. 中国油料, 1990(2): 7 - 10.
- [5] 文雁成, 张书芬, 王建平, 等. 甘蓝型油菜双低优质抗寒核不育两型系 8AB 的选育[J]. 中国油料作物学报, 2008(30) 专辑: 217 - 219.
- [6] 张书芬, 王建平, 朱家成, 等. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育恢复基因的遗传研究[J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 23 - 26.
- [7] 文雁成, 宋文光. 胞质不育杂交油菜中的不育株对产量的影响[J]. 中国油料, 1994(2): 1 - 3.
- [8] 赵坚义. 温、湿度对油菜波里马细胞质雄性不育基因表达影响的研究[C]//中国作物学会油料作物专业委员会. 中国油料作物科学技术新进展——1996 年油料作物学术年会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 153 - 158.
- [9] 胡胜武, 黄继英, 吴 宾, 等. 基因型及温度对陕 2A CMS 育性的影响[C]//中国作物学会油料作物专业委员会. 中国油料作物科学技术新进展——1996 年油料作物学术年会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 159 - 163.
- [10] Burns D R. Temperature and genotypic effects on the expression of Pol cytoplasmic male sterility in summer rape[J]. Canadian journal of plant sciences, 1991, 71: 655 - 661.
- [11] 李旭峰, 李 琳. 油菜萝卜质雄性不育系测交后代恢复材料 F_2 (TC1) 的选育及细胞遗传学研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(1): 108 - 110.
- [12] 李云昌, 蔡 明, 郑元本, 等. 甘蓝型油菜萝卜质雄性不育系的研究及恢保关系测定[J]. 中国油料, 1993(3): 8 - 11.
- [13] 林宏辉, 李旭峰, 贾勇炯. 甘蓝型油菜萝卜质雄性不育系盛花期一些生理特性的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 1996, 33(5): 615 - 619.
- [14] Pelletier G, Primard C, Vedel F *et al.* Molecular, phenotypic and genetic characterization of mitochondrial recombinants in rapeseed[C]. Proc 7th Int Rapeseed Cong, Poznan Poland, 1987: 113 - 118.
- [15] 南京农业大学. 田间试验和统计方法[M]. 北京: 农业出版社, 1992: 257 - 270.
- [16] 刘后利. 实用油菜栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 571 - 574.
- [17] 李树林, 周志疆, 周熙荣. 油菜显性核不育三系法制种[J]. 上海农业学报, 1995, 11(2): 21 - 26.
- [18] 周熙荣, 李树林, 周志疆, 等. 甘蓝型显性核不育双低油菜杂交新品种核杂 3 号的选育[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2003, 4: 304 - 308.
- [19] 陈凤祥, 胡宝成, 李强生, 等. 甘蓝型油菜隐性上位互作核不育双低杂交种皖油 14 的选育[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(1): 63 - 65.
- [20] 杨光圣, 傅廷栋. 甘蓝型油菜改良型不育系 RGCMS-1141A 的选育[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(3): 210 - 213.
- [21] Deloure R, Eber F, Renard M. Radish cytoplasmic male sterility in rapeseed: Breeding restorer lines with a good female fertility[C]. Proc 8th Int Rapeseed Cong, Saskatoon, Canada, 1995: 1506 - 1510.
- [22] Deloure R, Eber F, Renard M. Breeding double low restorer lines in radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.) [C]. Proc 9th Int Rapeseed Cong, Cambridge, UK, 1995: 6 - 8.