

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.02015

## 甘蓝型油菜隐性核不育系 20118A 的育性遗传及分子标记辅助选择

任梦阳<sup>1,2</sup> 倪西源<sup>2</sup> 王 灏<sup>3</sup> 陈 飞<sup>2</sup> 田建华<sup>3</sup> 黄吉祥<sup>2</sup> 李殿荣<sup>3</sup>  
赵坚义<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321000; <sup>2</sup> 浙江农业科学院作物与核技术利用研究所, 浙江杭州 310021; <sup>3</sup> 陕西省杂交油菜研究中心, 陕西大荔 715105

**摘 要:** 以 20118A 不育系和临保系与 20 个油菜品种(系)杂交测交后代为材料, 采用经典遗传学和分子标记辅助选择方法, 验证该不育系统遗传控制体系及等位基因分布频率; 探索利用连锁共显性标记筛选两型系和临保系基因型的高效性和准确率。研究表明, 6 个品种(系)与 20118A 测交产生的 F<sub>2</sub> 世代, 所有组合可育株 不育株均符合 3 : 1 或 13 : 3 分离规律, 而与 20118A-TAM 杂交产生的 6 个 F<sub>2</sub> 中 1 个呈 13 : 3 分离, 其余均为全可育, 育性符合 1 对隐性不育基因和 1 对隐性上位抑制基因互作控制的遗传模式。进而采取反向验证方法, 从 1 059 个 F<sub>2</sub> 分离单株中, 用新开发的 *Bnms<sub>3</sub>/Bnrf* 连锁共显性标记跟踪选择, 直接获得临保系(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf*)、纯合不育株(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*)和两型系可育株(*Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*) 70、69 和 135 株, 经测交或互交验证, 准确率均达 95% 以上。根据 20 个测交品种的后代分离, *BnRf* 位点上只出现 *Rf* 和 *rf* 两个等位基因, 推测第 3 个等位基因存在的频率很低, 基本可以根据两基因各 2 对等位基因互作原理开展分子标记辅助育种。

**关键词:** 甘蓝型油菜; 隐性上位核不育; 分子标记辅助选育; 两型系; 临保系

## Inheritance of Sterility in Genic Male Sterile Line 20118A and Marker-Assisted Selection in Hybrid Breeding of *Brassica napus* L.

REN Meng-Yang<sup>1,2</sup>, NI Xi-Yuan<sup>2</sup>, WANG Hao<sup>3</sup>, CHEN Fei<sup>2</sup>, TIAN Jian-Hua<sup>3</sup>, HUANG Ji-Xiang<sup>2</sup>, LI Dian-Rong<sup>3</sup>, and ZHAO Jian-Yi<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321000, China; <sup>2</sup> Institute of Crop and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; <sup>3</sup> Hybrid Rapeseed Research Center of Shaanxi Province, Dali 715105, China

**Abstract:** In the present study, 20 varieties/lines of *Brassica napus* were test-crossed with sterile line 20118A, and its temporary maintainer 20118A-TAM. Both traditional genetic analysis and molecular marker assisted technology were employed to confirm their genetic model of sterility with two-gene-control systems, to check the allelic distributions among normal rapeseed varieties or lines. Furthermore, the efficiency and accuracy of marker-assisted selection (MAS) for two-type line and temporary maintainers based on co-dominant markers were also investigated. The results showed that the segregation proportion of male fertile to sterile plants in F<sub>2</sub> progenies from six varieties (lines) crossed with 20118A fitted Mendelian segregation (3:1 and 13:3), and that with 20118A-TAM showed either 13:3 or full male fertile, indicating that the sterility of 20118A is controlled by one recessive sterile gene interacting with a recessive epistatic suppression gene. In addition, a reverse validation approach based on *Bnms<sub>3</sub>* and *Bnrf* linked marker assisted selection was used to further confirm the two gene control system. In a total of 1059 F<sub>2</sub> plants, 70, 69, and 135 individuals carrying temporary maintainer (*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf*), homozygous sterile (*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*) and fertile (*Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*) marker genotypes were screened out, respectively, which also fitted the Mendelian segregation proportions of two gene models (1/16, 1/16, and 1/8). After test-crossing with known homozygous sterile plants or temporary maintainers or one another among marker genotypes, higher than 95% of lines were approved to be the expected genotypes. Finally, according to the information from 20 testcross cultivars/lines, only two alleles of *Rf* and *rf* were observed on *BnRf* locus, implying the third allele naturally existed very few, if any. Therefore, for practical breeding purpose, a marker assisted selection strategy simply based on *BnRf/rf* and *BnMs<sub>3</sub>/ms<sub>3</sub>* linked co-dominant markers is proposed.

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2011AA10A104)和浙江省科技厅重大专项(2011C12005)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 赵坚义, E-mail: jyzhao3@yahoo.com, Tel: 0571-86403406

第一作者联系方式: E-mail: yun2006717@163.com, Tel: 18675620771

Received(收稿日期): 2012-02-11; Accepted(接受日期): 2012-04-16; Published online(网络出版日期): 2012-05-11.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120511.1538.018.html>

**Keywords:** *Brassica napus* L.; Recessive genic male sterility; Molecular marker assisted selection; Two-type line; Temporary maintainer

根据经典遗传学的研究和分析,陈凤祥于1993年提出甘蓝型油菜隐性核不育9012A,认为不育性由2对隐性重叠基因和1对隐性上位抑制基因互作控制<sup>[1]</sup>,进而创立了三系杂种利用模式<sup>[2]</sup>,为油菜核不育杂种优势利用开辟了一条新途径。继后孙超才等<sup>[3]</sup>报道的20118A和王军等<sup>[4]</sup>选育的ZWA核不育系统均属相同遗传模式。徐小栋等<sup>[5]</sup>利用陕西省杂交油菜研究中心提供的纯合两型系和临保系/全不育系DNA(9012A)构建不育、可育基因池,筛选育性相关连锁标记,以上海市农业科学院选育的沪油杂1号(20118A)分离后代为定位群体,用SG-图谱<sup>[6]</sup>标记进行全基因组扫描,将*Bnms<sub>3</sub>*定位于甘蓝型油菜A10连锁群280 kb区间,将*Bnrf*定位于A7连锁群4.0 Mb左右的区域内,但未发现*Bnms<sub>4</sub>*连锁标记。倪西源等<sup>[7]</sup>开发位点特异性标记,进一步将*Bnms<sub>3</sub>*精细定位至约100 kb范围内。最近,烜峰等<sup>[8]</sup>根据分子标记检测,董发明等<sup>[9]</sup>采用常规遗传分析方法,倪西源等<sup>[10]</sup>通过标记辅助选择临保系基因型对该系统的育性遗传模式做出了新的解释,一致认为9012A不育系统可能只受2对基因互作调控。2010年先正达(Syngenta)国际种子子公司获得专利授权的新核不育系统(Stiewe等,2010,US20100222605A1),也提出2对基因控制的遗传模式,认为利用临保系(*msmsrfrf*)和不育系(*MsMsrf*)基因型,加以对不育系的热击处理,可安全高效实施三系制种。该系统可能与9012A的育性遗传模型类似。

9012A具有高度不育稳定性和广谱恢复源的独特优势,近十几年来,通过审定的杂交种有皖油系列、部分核优系列、沪油杂系列、向农03、部分绵油系列等13个,2010年国审的31个杂交油菜新品种中,该不育系统衍生的杂交种占3个。目前9012A不育系统在我国尚未得到广泛应用,种植面积还非常有限。其主要原因是育性受2对基因互作控制,分离后代各种基因型混杂,常规方法选育不仅工作量大、周期长而且中选率低还难以获得遗传稳定的全不育系。随着分子生物学技术的发展和芸薹属基因组测序数据的不断更新,华中农业大学油菜育种研究所在对*Bnms<sub>3</sub>*和*Bnrf*基因定位和克隆研究等方面做出了突出贡献<sup>[11-16]</sup>。通过图位克隆已获得控制*Bnms<sub>3</sub>*位点基因*BnaC.Tic40*(At5g16620)<sup>[17]</sup>,精细定位了*Bnrf*<sup>[13-14]</sup>,并获得了与*Bnrf*连锁共显性标记<sup>[8]</sup>,

为目标基因的克隆和标记辅助选择奠定了基础。

然而已发表的标记,尤其是*Bnms<sub>3</sub>*连锁标记,仍大多为显性标记,未能有效筛选出杂合基因型植株,而且部分标记与目标基因尚有一定距离,在一定程度上阻碍了标记辅助育种的应用。倪西源等<sup>[10]</sup>新近利用前人发表的显性连锁标记辅助选育临保系基因型,准确率达到91.9%,但迄今尚无利用共显性标记同时筛选两型系和临保系基因型的研究报道。

本研究是在前人工作基础上,同时采用分子标记辅助选择和经典遗传学分析方法,利用新开发的与*Bnms<sub>3</sub>*和*Bnrf*更为紧密连锁的共显性标记,以源于20118A(沪油杂1号中分离)系统不育系和临保系以及分别与20个油菜品种(系)杂交测交后代为材料,同时分析F<sub>2</sub>世代的田间育性分离规律和连锁标记的跟踪选择效果,进一步验证2对基因控制体系以及*Bnrf*位点上等位基因的分布频率;通过*Bnms<sub>3</sub>*和*Bnrf*连锁共显性标记的辅助,在分离后代中筛选出两型系和临保系基因型单株,并验证标记选择的准确率和育种应用的高效性。为我国油菜隐性核不育9012A(20118A,ZWA)系统的分子育种应用提供理论与事实依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

两型系20118AB和临保系(temporary maintainer line)20118A-TAM是从甘蓝型油菜隐性上位互作核不育杂种沪油杂1号后代分离群体中经多年多代兄妹交及测交选育而来,与9012A为相同遗传模式<sup>[3]</sup>。用于杂交和测交的20个遗传背景各不相同的品种(系)来源及20个组合编号列于表1。

### 1.2 F<sub>2</sub>世代田间育性调查

2008—2010年在浙江省农业科学院农场试验田,将6个品种(系)XY15、HY0901、BH、ZS11、PIN6672和HUA-P1087,分别与20118A和20118A-TAM杂交/测交,种植F<sub>1</sub>并套袋自交,单株收获种子播成小区,花期按小区调查F<sub>2</sub>代育性,并分析不育/可育株分离比例适合性。与正常可育株相比,不育株花蕾、花瓣较小,开花时可观察到无雄蕊,或有短小雄蕊但花药空瘪、无花粉、败育彻底,不受生长季节温度影响。

表 1 20 个品种(系)及与不育系和临保系测交组合(F<sub>2</sub>)  
Table 1 Twenty varieties (lines) and F<sub>2</sub> generations from varieties × sterile/temporary maintainers

品种(系)代号 Code of variety (line)	来源(产地) Origin	品种(系)名称 <sup>a</sup> Name of variety (line)	杂交组合代号 Code of cross	组合 Combination (F <sub>2</sub> )
XY15	Hunan, China	湘油 15 Xiangyou 15	G01	20118A×XY15
HY0901	Zhejiang, China	品系 Breeding line	G02	20118A×HY0901
ZS11	Hubei, China	中双 11 Zhongshuang 11	G03	20118A×ZS11
PIN6672	Zhejiang, China	品系 Breeding line	G04	20118A×PIN6672
BH	Zhejiang, China	小孢子培养加倍二倍体 Doubled haploid	G05	20118A×BH
HUA-P1087	Zhejiang, China	品系 Breeding line	G06	20118A ×HUA-P1087
ZS8	Hubei, China	中双 8 号 Zhongshuang 8	G07	XY15×20118A-TAM
ZS3	Zhejiang, China	浙双 3 号 Zheshuang 3	G08	ZS8×20118A-TAM
ZS6	Zhejiang, China	浙双 6 号 Zheshuang 6	G9	M37×20118A-TAM
Z07059	Zhejiang, China	小孢子培养加倍二倍体 Doubled haploid	G10	ZS758×20118A-TAM
ZS758	Zhejiang, China	浙双 758 Zheshuang 758	G11	ZS3×20118A-TAM
ZY18	Zhejiang, China	浙油 18 Zheyong 18	G12	ZY18×20118A-TAM
J5	Zhejiang, China	品系 Breeding line	G13	E65-1×20118A-TAM
J7	Zhejiang, China	品系 Breeding line	G14	J5×20118A-TAM
E65-1	Zhejiang, China	品系 Breeding line	G15	J7×20118A-TAM
M3	Zhejiang, China	小孢子培养加倍二倍体 Doubled haploid	G16	M3×20118A-TAM
M37	Zhejiang, China	小孢子培养加倍二倍体 Doubled haploid	G17	M24×20118A-TAM
M24	Zhejiang, China	小孢子培养加倍二倍体 Doubled haploid	G18	ZS6×20118A-TAM
NPZ0801	Germany	小孢子培养加倍二倍体 Doubled haploid	G19	NPZ0801×20118A-TAM
NPZ0802	Germany	品系 Breeding line	G20	NPZ0802×20118A-TAM

<sup>a</sup> 高于 F<sub>6</sub> 世代的稳定自交系品系。 <sup>a</sup> Pedigree selected inbreeding line above F<sub>6</sub> generation.

1.3 标记基因型的测交验证

将用于测交的纯合不育株 20118A 与临保系 20118A-TAM 测交确认真实基因型; 再将标记为临保系(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf*)和两型系基因型(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*/*Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*)的单株分别与纯合不育株(20118A)或临保系(20118-TAM)测交; 3 种标记基因型(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*/*Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*, *ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf*)间兄妹交或测交。2011 年春田间观察所有杂交后代的育性分离比例, 检测标记辅助选择的准确率。

1.4 连锁标记筛选

研究中所用与 *Bnms<sub>3</sub>* 基因连锁的 PBI 和 Ms3-32 以及与 *Bnrf* 连锁的 MR166 均为作者所在实验室新近筛选和开发的共显性分子标记<sup>[5]</sup>, Ar23 是前人发表的 *Bnms<sub>3</sub>* 连锁显性标记<sup>[16]</sup>。根据在 1896 株分离群体中的定位结果, PBI 和 AR23 位于 *Bnms<sub>3</sub>* 一侧, 分别相距 2.1 cM 和 0.6 cM; MS3-32 位于另一侧, 距离 *Bnms<sub>3</sub>* 0.1 cM; MR166 在 861 个单株的分离群体中距离 *Bnrf* 约 3.2 cM (4.0 Mb)<sup>[5]</sup>, 4 个连锁标记各 3 种基因型的分离图谱如图 1 所示, 标记来源和引物序列见表 2。标记 MR166, 在 *Rfrf* 杂合状态时, 除 300 bp 左右位置上有一条清晰的共显性条带外, 在 200~

300 bp 之间还有一条在 *RfRf* 和 *rfrf* 中均未出现的特异带, 我们在其他标记分析中也发现这种现象, 推测可能是 2 条差异带以某种形式结合产生的特异条带。从标记辅助选择的角度看, 有助于判断 *Rfrf* 和 *rfrf* 基因型。

1.5 标记辅助选择

采用改良后的 CTAB 方法<sup>[5]</sup>提取单株小苗嫩叶 DNA。利用与 *Bnms<sub>3</sub>* 基因连锁标记 PBI、Ar23 和 Ms3-32 分别筛选出 *ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>*、*Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>* 和 *Ms<sub>3</sub>Ms<sub>3</sub>* 基因型; 同时, 利用与 *Bnrf* 基因连锁标记 MR166 区分 *RfRf*、*Rfrf*、*rfrf* 三种基因型; 最后筛选出标记基因型为临保系(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf*)和两型系(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*/*Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*)单株。

2 结果与分析

2.1 经典遗传学分析

2010 年春, 对由 20118A 和 20118A-TAM 分别与 XY15、HY0901、BH、ZS11、PIN6672 和 HUA-P1087 杂交产生的 12 个组合 F<sub>2</sub> 代育性观察记载(表 3)发现, 组合 20118A×XY15 的育性分离出现 3 1 (可育 不育)而 XY15×20118A-TAM 则呈 13

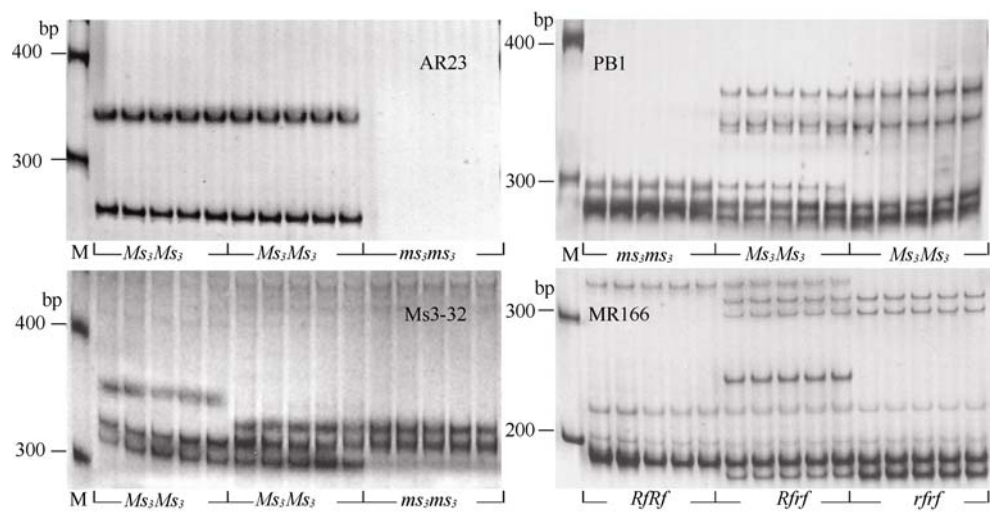


图 1 与 *Bnms<sub>3</sub>* 连锁显性标记 AR23、共显性标记 PBI 和 MS3-32 及 *Bnrf* 连锁的标记 MR166 在 3 种基因型中的扩增图谱  
Fig. 1 Amplification profiles in three genotypes for dominant marker AR23 and co-dominant markers PBI and MS3-32 linked with *Bnms<sub>3</sub>* and marker MR166 linked with *Bnrf*

表 2 用于辅助选择的连锁标记  
Table 2 Linked markers used for assisted selection

连锁标记 Linked marker	引物序列 Primer sequence (5'-3')	片段长度 Product length (bp)	多态性 Polymorphism	连锁基因 Linked gene	标记所在基因组 Genome
PBI	F: GTCTGTTCTCTTCCCGTTGTC R: GTGCTGCTCCGGTGTTATC	270	共显性 Co-dominant	<i>Bnms<sub>3</sub></i>	A10
Ar23	F: TTGTTTCGCAAATGGTTTTTC R: TATGGCCATCTCCAGACTGA	268	显性 Dominant	<i>Bnms<sub>3</sub></i>	A10
Ms3-32	F: TGTTCATACATATGCCCCCA R: GGCATTGTTCCAATCGAAGT	311	共显性 Co-dominant	<i>Bnms<sub>3</sub></i>	A10
MR166	F: GAATCCTCGAAGCTATATTCA R: ACAATTAGGGTTTCTCGTCTA	300	共显性 Co-dominant	<i>Bnrf</i>	A7

表 3 12 个组合 F<sub>2</sub> 代育性表现  
Table 3 Fertility segregation of the F<sub>2</sub> populations from 12 crosses

组合 Combination	总株数 TNP	可育株数 MF	不育株数 MS	适合分离比(MF : MS)( $\chi^2$ )	
				3 : 1	13 : 3
20118A×XY15	187	132	55	1.713	
20118A×HY0901	96	81	15		0.427
20118A×BH	63	55	8		1.143
0118A×ZS11	173	132	40		1.893
20118A×PIN6672	192	153	39		0.214
20118A×HUA-P1087	180	139	41		1.662
XY15×20118A-TAM	200	162	38		0.000
HY0901×20118A-TAM	96	96	0		
BH×20118A-TAM	96	96	0		
ZS11×20118A-TAM	95	95	0		
PIN6672×20118A-TAM	100	100	0		
HUA-P1087×20118A-TAM	102	102	0		

$\chi^2_{0.05,1} = 3.84$ . TNP: total number of plants; MF: male fertile plants; MS: male sterile plants.

3 的分离规律, 符合 1 对隐性不育基因和 1 对隐性上位抑制基因互作控制的分离规律; 因此, 推断湘油 15 的基因型为  $Ms_3Ms_3RfRf$ 。20118A 与 HY0901、BH、ZS11、PIN6672 和 HUA-P1087 杂交的  $F_2$  代育性分离比均符合 13 : 3; 而与 20118A-TAM 和 MSL-TAM 测交  $F_2$  代表现全可育, 亦符合 2 对基因互作控制的分离规律, 推测这 5 个品种(系)的基因型均为  $Ms_3-Ms_3rfrf$ 。所观察的 14 个组合  $F_2$  中未发现符合 15 : 1 或 61 : 3 等育性分离比例。

## 2.2 分子遗传学分析

### 2.2.1 用已知基因型验证标记基因型

利用反向验证方法, 在二基因互作控制育性的遗传模式指导下, 2010—2011 年, 利用与 *Bnms<sub>3</sub>* (PBI、Ar23 和 MS3-32)和 *Bnr<sub>f</sub>* (MR166)紧密连锁的分子标记(表 2)对 G02-G04 以及 G06-G20 共 18 个杂交组合  $F_2$  分离世代进行标记分析, 筛选  $ms_3ms_3rfrf$ 、 $Ms_3ms_3RfRf$  和  $ms_3ms_3RfRf$  三种基因型单株。结果发现 G9~G20 所有 12 个组合的  $F_2$  世代均表现全可育(表 4), 标记鉴定 *Bnr<sub>f</sub>* 位点无分离, 全部为 *rfrf* 基因型, 用 *Bnms<sub>3</sub>* 连锁标记 Ms3-32/AR23 分析单株 1 152 株, 获得临保系标记基因型( $ms_3ms_3rfrf$ ) 268 株, 符合 1 对等位基因差异的分离规律( $\chi^2_c=1.760<\chi^2_{0.05}$ ); 另从 G02、G03、G04、G06、G07、G08 组合的  $F_2$  分离群体中, 用 *Bnms<sub>3</sub>* 和 *Bnr<sub>f</sub>* 连锁标记筛选, 从 1 059 个单株中筛选出 70 株临保系标记基因型, 约占 1/16, 符合 2 对基因互作后代分离规律( $\chi^2_c=0.177<\chi^2_{0.05}$ )(表 4)。合计从 18 个组合的 2 211 个单株中, 筛选出标记临保系 338 株, 随机选取其中 74 株(每组合 2~6 株)与纯合不育系 20118A 测交, 花期调查后代育性, 结果 68 个单株的测交后代(小区)表现全不育, 可确认其为真实临保系基因型, 其余 6 个单株的测交后代中有不等量可育株出现, 但经适合性测验除来自组合 G16 的 1 个单株(推测实际基因型为  $Ms_3ms_3rfrf$ )测交后代 1 : 1 分离外, 其余 5 个小区仍符合临保系基因型测交后代全不育的规律, 推测小区内出现 1~2 个可育株的现象可能是机械混杂所致。同时, 从 5 个  $F_2$  育性分离组合(G02、G03、G04、G06 和 G07)的 963 个单株中检测出标记型纯合不育株 69 株, 也约为 1/16 ( $\chi^2_c=1.225<\chi^2_{0.05}$ )随机选取 25 株与 20118A-TAM 测交(表 5), 结果除 G04 组合中 1 株检测有误外(推测实际基因型为  $ms_3ms_3RfRf$ ), 其余 24 个测交后代均表现全不育。表明 25 株标记型纯合不育株中, 只有 1 株错误。综合分析表 4 和表 5, 初步表明利用标记选择临保系基因型的准确率为 98.8%, 选择纯合不育

株的符合率平均达到 96.0%。

另从 G08 组合的 96 个分离单株中, 选出两型系可育株标记基因型 12 株( $\chi^2_c=0.000<\chi^2_{0.05}$ ), 随机与 20118A 测配 9 株, 后代育性均 1 : 1 (可育 : 不育)分离, 确认所选标记基因型为两型系可育株( $Ms_3ms_3RfRf$ ) (表 5)。

### 2.2.2 标记基因型间测交验证

在标记辅助选育中, 为确保遗传背景纯合一致, 我们通常需要在多个世代回交自交的分离大群体内同时筛选出两型系和临保系基因型, 再相互测交验证, 获得遗传稳定且表型一致的两型系和临保系用于三系化制种。本研究从 6 个(G02、G03、G4、G06、G7 和 G08)组合  $F_2$  分离群体选出的标记型为  $ms_3ms_3rfrf$ 、 $ms_3ms_3RfRf$  和  $Ms_3ms_3RfRf$  的单株中, 随机选取其中生长良好的  $ms_3ms_3RfRf$  标记型不育株 20~30 株, 分别与 10 株临保系( $ms_3ms_3rfrf$ )和 22 株两型系可育株标记型( $Ms_3ms_3RfRf$ )逐株测交, 观察后代( $F_1$ )育性分离。结果显示, 所有与临保系标记型测交的 10 个小区均符合全不育分离规律; 与两型系可育株标记型( $Ms_3ms_3RfRf$ )单株杂交的 22 个后代育性分离均符合 1 : 1 卡方检测。说明标记选出的 3 种目标基因型准确率在本研究小范围内达到了 100% (表 6)。

## 3 讨论

### 3.1 20118A 的遗传控制体系和 *Bnr<sub>f</sub>* 位点等位基因频率

最近, 烱峰等<sup>[8]</sup>应用分子标记和回交自交试验, 董发明等<sup>[9]</sup>采用大群体多材料常规遗传分析方法以及倪西源等<sup>[7]</sup>通过标记辅助选择临保系基因型对陈凤祥 1993 年<sup>[1]</sup>提出的隐性上位互作核不育三基因遗传模式进行了修正, 一致认为该不育系统育性可能只受 2 对基因(*Bnms<sub>3</sub>* 和 *BnRf*)互作控制, 但 *BnRf* 基因位点存在 3 个复等位基因。董发明等<sup>[9]</sup>提出存在野生型可育基因( $Rf^c$ )、突变恢复型可育基因( $Rf^a$ )和突变不育基因( $Rf^b$ ), 三者的显隐性关系为  $Rf^a > Rf^b > Rf^c$ 。烱峰等<sup>[8]</sup>认为该位点存在可育恢复基因 *Ms*、不育基因 *ms* 和隐性上位基因 *rf* 3 个复等位基因, *Ms* 对 *ms* 为显性, 起恢复育性的作用, *ms* 对 *rf* 为显性, 为不育基因, *rf* 为隐性上位基因, 纯合的 *rf* 对  $ms_3ms_3$  起抑制不育的作用, 使基因型  $ms_3ms_3rfrf$  表现可育。本研究采用遗传背景各异的多个品种(系)为杂交测交亲本, 从经典和分子遗传学两个方向同时对 20118A 进行遗传分析和验证, 12 个组合的  $F_2$  群体育性分离比例和基于 *BnMs<sub>3</sub>/ms<sub>3</sub>* 和 *BnRf/rf* 二基因遗传

表 4 标记辅助筛选临时保系(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf*)基因型  
Table 4 Marker-assisted selection for temporary maintainers *ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf* and validation by test-cross

组合代号 Code of cross (F <sub>2</sub> )	选用标记 Marker used	分析单株数 No. of plants analyzed (F <sub>2</sub> )	<i>ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf</i> 标记型株数 No. of <i>ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rfrf</i> marker types	测交株数 No. of testcross plants	测交小区 F <sub>1</sub> 育性 <sup>a</sup> F <sub>1</sub> sterility in plots <sup>a</sup>			
					小区数 No. of plots	不育株 MS	可育株 MF	符合率 Coincidence rate (%)
G09	Ms3-32	96	20	5	4(1)	31(25)	0(1)	100
G10	Ms3-32	96	22	2	2	35	0	100
G11	Ms3-32	96	23	6	5(1)	97(28)	0(1)	100
G12	Ms3-32	96	19	6	6	99	0	100
G13	Ms3-32	96	23	2	2	23	0	100
G14	Ms3-32	96	20	2	2	29	0	100
G15	Ms3-32	96	21	5	5	37	0	100
G16	Ms3-32	96	25	3	2(1)	36(12)	0(10)	66.7
G17	Ms3-32	96	24	5	5	72	0	100
G18	Ms3-32	96	22	2	2	33	0	100
G19	Ms3-32	96	22	4	3(1)	54(22)	0(2)	100
G20	Ar23	96	27	5	5	117	0	100
总计 Total		1152	268	47	43(4)			
G02	PBI/MR166	96	6	2	2	40	0	100
G03	Ar23/MR166	173	10	6	5(1)	202(41)	0(2)	100
G04	Ar23/MR166	192	11	4	4	179	0	100
G06	Ar23/MR166	180	10	4	4	188	0	100
G07	PBI/Ms3-32/MR166	322	24	5	4(1)	77(39)	0(1)	100
G08	PBI/MR166	96	9	6	6	95	0	100
总计 Total		1059	70	27	25(2)			98.8

<sup>a</sup>: 括号中数据为有可育株出现的小区数以及不育和可育的株数。

<sup>a</sup>: numbers in the bracket indicate the No. of plot having fertile plants or No. of sterile and fertile plants. MF: male fertile plants; MS: male sterile plants.

表 5 标记辅助筛选两型系(*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf/Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*)基因型  
Table 5 Marker-assisted selection for two-type lines (*ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf/Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*)

组合代号 Code of cross (F <sub>2</sub> )	选用标记 Marker used	分析单株数 No. of plants analyzed (F <sub>2</sub> )	<i>ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf</i> 标记型株数 No. of <i>ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf</i> marker types	测交株数 No. of testcross plants	测交小区 F <sub>1</sub> 育性 F <sub>1</sub> sterility in plots				
					小区数 No. of plots	不育株 MS	可育株 MF	卡方 (1:1) MF:MS	符合率 Coincidence rate (%)
<i>ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf</i> × 20118A-TAM									
G02	PBI/MR166	96	7	4	4	45	0		100
G03	Ar23/MR166	173	12	7	7	292	0		100
G04	Ar23/MR166	192	13	6	5(1)	213(21)	0(23)		75.0
G06	Ar23/MR166	180	11	2	2	188	0		100
G07	PBI/Ms3-32/MR166	322	26	6	6	215	0		100
总数 Total		963	69	25	24(1)				96.0
20118A-A × <i>Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf</i>									
G08	PBI/MR166	96	12 <sup>a</sup>	9	9	163	161	0.003	100

括号中数据含义同表 4。<sup>a</sup> *Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf* 标记型株数。

Numbers in the bracket indicate the same as in Table 4. <sup>a</sup> No. of *Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf* marker types. MF: male fertile plants; MS: male sterile plants.

表 6 三种标记基因型间测交验证  
Table 6 Test-cross validation among three marker genotypes

测交组合 Test-cross	所用标记 Marker used	测交组合数 No. of test-cross	测交小区 F <sub>1</sub> 育性观察 F <sub>1</sub> sterility observation at test-cross district			符合率 Coincidence rate (%)
			不育株 MS	可育株 MF	卡方值(1:1) MF:MS	
G02A×G02T	Ar23/MR166	1	50	0		100
G03A×G03T	Ar23/MR166	2	49	0		100
G06A×G06T	Ar23/ MR166	3	85	0		100
G07A×G07T	PBI/Ms3-32/MR166	3	112	0		100
G08A×G08T	PBI/MR166	1	32	0		100
总数 Total		10	328	0		100
G02A×G02B	Ar23/MR166	4	66	57	0.520	100
G03A×G03B	Ar23/MR166	3	56	59	0.035	100
G06A×G06B	Ar23/ MR166	3	40	38	0.013	100
G07A×G07B	PBI/Ms3-32/Mr166	9	104	103	0.000	100
G08A×G08B	PBI/MR166	3	41	57	2.296	100
总数 Total		22	307	314	0.000	100

G02A×G02T, G02A×G02B: G02(F<sub>2</sub>)分离群体中, 纯合不育标记型×临保系标记型, 纯合不育标记型×两型系可育株标记型。  
G02A×G02T, G02A×G02B: test-cross between marker genotypes *ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf* and *ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rf<sub>1</sub>rf<sub>1</sub>*, *ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf* and *Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf* in F<sub>2</sub> of G02.

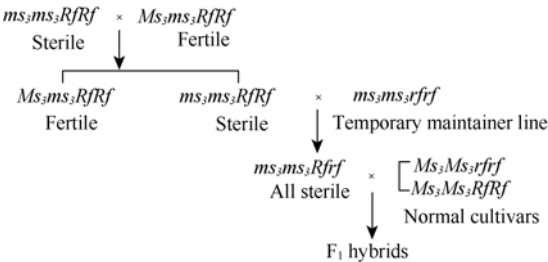


图 2 2 对基因互作三系制种模式  
Fig. 2 Three-line hybrid seed production based on the two-gene controlled system

模式的连锁标记辅助选育都支持 20118A 均由 1 对隐性不育基因和 1 对隐性上位抑制基因互作控制, 与 赵峰等<sup>[8]</sup>和董发明等<sup>[9]</sup>提出的 2 对基因控制的遗传理论基本是一致的。两型系基因型为 *ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf* 和 *Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>RfRf*, 临保系基因型为 *ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>rf<sub>1</sub>rf<sub>1</sub>*, 也与 2010 年获得专利授权的新核不育系统(Stiewe 等, 2010, US20100222605A1)遗传模式本质上相同。本研究共涉及 20 个杂交亲本, 所有 F<sub>2</sub> 育性分离比例都符合 2 对基因各有 2 个等位基因分离的组合模式。前期研究中, 我们利用 SG-图谱<sup>[6]</sup>均匀选取 19 条连锁群上的分子标记进行全基因组搜索, 亦未发现 *Ms<sub>4</sub>/ms<sub>4</sub>* 位点。由此推测赵峰<sup>[8]</sup>和董发明等<sup>[9]</sup>报道的第 3 个复等位基因(*Rf<sup>c</sup>* 或 *Ms<sub>4</sub>/ms<sub>4</sub>*)自然存在的频率可能非常低, 这与报道的结果也是相一致的。因此我们认为在标记辅助育种实践中, 基本可以按 *Ms<sub>3</sub>/ms<sub>3</sub>* 和 *Rf/rf* 两对基因互作模式进行育种筛选(图 2)。

根据我们对 100 个国内外品种资源 *BnMs<sub>3</sub>/ms<sub>3</sub>* 位点的检测, 所有材料均含纯合可育等位基因 *Ms<sub>3</sub>Ms<sub>3</sub>* (图略), 这也许是该不育系统具有广谱恢复系的根源所在。另从本研究中对 20 个品种(系)和临保系测交 F<sub>2</sub> 代育性观察, 除湘油 15 和中双 8 号为 *Ms<sub>3</sub>Ms<sub>3</sub>RfRf* 基因型外, 其余 18 个品种(系)均为 *Ms<sub>3</sub>Ms<sub>3</sub>rf<sub>1</sub>rf<sub>1</sub>* 基因型。说明在 *BnRf/rf* 位点上, 约 90% 的甘蓝型油菜品种(品系)携带纯合 *rf<sub>1</sub>rf<sub>1</sub>* 等位基因。

3.2 分子标记辅助选育极大提高育种效率和选择准确率

从 1993 年陈凤祥等<sup>[1]</sup>提出隐性上位互作核不育三基因遗传机制和创立三系杂种利用模式以来已有 17 年。在这期间我国育种家主要通过大量田间组合测配, 大面积种植观察和大海捞针般地筛选临保系和两型系基因型, 育种效率不高, 育种进程缓慢, 而且得到的全不育系通常只是生物学意义上的杂交 F<sub>1</sub> 代, 实际商用杂交种大多是三交种, 导致不同程度优势下降和生长整齐度欠佳等问题, 这是该不育系统至今仍未能在我国油菜生产上成为主打产品之一的主要原因。

本研究在前人工作基础上, 利用多组合大分离群体, 对 3 种目标基因型进行标记辅助筛选, 较好地显示了分子技术在油菜杂交种选育中的高效性和准确性。根据 2 对基因互作机制, 在 1 个二基因杂合的分离后代(*Ms<sub>3</sub>ms<sub>3</sub>Rf<sub>1</sub>rf<sub>1</sub>*, 可获得 3 种目标基因型)中,

纯合不育株的选中概率是 1/3 (理论上 3 株不育株中含 1 株纯合不育株), 两型系可育株为 2/13, 而临保系基因型只有 1/13。即要从杂合基因型的分离后代中筛选出 1 对两型系基因型, 至少要用 6~7 个可育株分别与 3 株不育株测交产生约 20 个组合, 同时套袋自交; 要获得 1 株临保系基因型, 则至少需配制 13 个测交组合(在已知纯合不育株基因型的情况下)。同时对大量测交自交后代进行大田种植仔细调查花期育性, 小区要有足够的植株才能正确判断目标基因型, 因此要改良和选育出优良新不育系非常艰难。但如果有紧密连锁的分子标记作为指示跟踪选择, 育种效率和选择的准确率将大幅度提高。本研究从 6 个组合的  $F_2$  分离世代共 1 059 个被检单株中, 标记辅助可直接筛选出临保系( $ms_3ms_3rfrf$ )、纯合不育株( $ms_3ms_3RfRf$ )和两型系可育株( $Ms_3ms_3RfRf$ )各 70 (表 4)、69 (表 5)和 135 株(数据未显示), 这些检出的目标基因型单株无论是与已知临保系或不育系杂交还是相互测交验证, 准确率都达到 95%以上, 充分显示出分子标记辅助选育在油菜隐性核不育杂交种选育中的重要作用。

#### 4 结论

20118A 的育性由 1 对隐性不育基因和 1 对隐性上位抑制基因互作控制, 根据 20 个测交品种的后代分离鉴定,  $BnRf$  位点上只出现  $Rf$  和  $rf$  两个等位基因, 推测第 3 个等位基因存在的频率很低。因此在油菜育种中, 可以根据两基因各 2 对等位基因互作原理开展分子标记辅助选育。在回交自交分离世代中经共显性标记辅助跟踪选择, 直接获得临保系和两型系基因型的准确率均达 95%以上。

致谢: 感谢上海市农业科学院孙超才研究员提供沪油杂 1 号种子。

#### References

- [1] Chen F-X(陈凤祥), Hu B-C(胡宝成), Li Q-S(李强生), Zhang M-L(张曼琳). Discovery and initial study of genic male sterility material 9012A in *Brassica napus* L. *J Beijing Agric Univ* (北京农业大学学报), 1993, 19(suppl): 57–61 (in Chinese with English abstract)
- [2] Chen F-X(陈凤祥), Hu B-C(胡宝成), Li C(李成), Li Q-S(李强生), Chen W-S(陈维生), Zhang M-L(张曼琳). Genetic studies on GMS in *Brassica napus* L.: I. Inheritance of recessive GMS line 9012A. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1998, 24(4): 431–438 (in Chinese with English abstract)
- [3] Sun C-C(孙超才), Zhao H(赵华), Wang W-R(王伟荣), Li Y-L(李延莉), Qian X-F(钱小芳), Fang G-H(方光华). Inheritance and utilization of recessive genic male sterile line 20118A in *Brassica napus* L. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2002, 24(4): 1–4 (in Chinese with English abstract)
- [4] Wang J(王军), Zhang T-P(张太平), Wei Z-F(魏忠芬), Li D-W(李德文). Inheritance and utilization of recessive genic male sterile line ZWA in *Brassica napus* L. *Seed* (种子), 2004, 23(5): 8–11 (in Chinese with English abstract)
- [5] Xu X-D(徐小栋). Molecular Mapping of Sterile Genes Involved in Recessive Epistatic Genic Male Sterile System in *Brassica rapa* L. MS Thesis of Zhejiang Normal University, 2010. pp 1–55 (in Chinese with English abstract)
- [6] Zhao J Y, Huang J X, Chen F, Xu F, Ni X Y, Xu H M, Wang Y L, Jiang C C, Wang H, Xu A X, Huang R Z, Li D R, Meng J L. Molecular mapping of *Arabidopsis thaliana* lipid-related orthologous genes in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 2012, 124: 407–421
- [7] Ni X Y, Xu X D, Ren M Y, Xu F, Huang J X, Chen F, Zhao J Y. Fine mapping and candidate gene identification of a recessive genic male sterility gene ( $Bnms_3$ ) in rapeseed. In: Proc 13th International Rapeseed Congress, Prague, 2011. pp 632–635
- [8] Zu F(俎锋), Xia S-Q(夏胜前), Dun X-L(顿小玲), Zeng F-Q(曾芳琴), Yi B(易斌), Wen J(文静), Ma Z-Z(马朝芝), Shen J-X(沈金雄), Tu J-X(涂金星), Fu T-D(傅廷栋). Analysis of genetic model for a recessive genic male sterile line 7-7365AB in *Brassica napus* L. based on molecular markers. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2010, 43(15): 3067–3075 (in Chinese with English abstract)
- [9] Dong F-M(董发明), Hong D-F(洪登峰), Liu P-W(刘平武), Xie Y-Z(谢彦周), He Q-B(何庆彪), Yang G-S(杨光圣). A novel genetic model for recessive genic male sterility line 9012AB in rapeseed (*Brassica napus* L.). *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2010, 29(3): 262–267 (in Chinese with English abstract)
- [10] Ni X-Y(倪西源), Xu X-D(徐小栋), Huang J-X(黄吉祥), Chen F(陈飞), Zhou W-J(周伟军), Zhao J-Y(赵坚义). Marker assisted selection for temporary maintainers of a recessive epistemic genic male sterility in *Brassica napus* L. *J Zhejiang Univ* (Agric & Life Sci) (浙江大学学报·农业与生命科学版), 2011, 37(4): 407–412 (in Chinese with English abstract)
- [11] Wang G-C(王贵春). Development of Molecular Markers Linked to Sterility Genes of a Recessive Genic Male Sterile Two-Type Line 9012AB in *Brassica rapa* L. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2007. pp 1–90 (in Chinese with English abstract)
- [12] Ke L P, Sun Y Q, Hong D F, Liu P W, Yang G S. Identification of AFLP markers linked to one recessive genic male sterility gene in oilseed rape, *Brassica napus*. *Plant Breed*, 2005, 124: 367–370
- [13] Xie Y Z, Hong D F, Xu Z H, Liu P W, Yang G S. Identification of AFLP markers linked to the epistatic suppressor gene of a recessive genic male sterility in rapeseed and conversion to SCAR



- markers. *Plant Breed*, 2008, 127: 145–149
- [14] Xiao L, Yi B, Chen Y F, Huang Z, Chen Wei, Ma C Z, Tu J X, Fu T D. Molecular markers linked to *Bn;rf*: a recessive epistatic inhibitor gene of recessive genic male sterility in *Brassica napus* L. *Euphytica*, 2008, 164: 377–384
- [15] Huang Z, Chen Y F, Yi B, Xiao L, Ma C Z, Tu J X, Fu T D. Fine mapping of the recessive genic male sterility gene (*Bnms<sub>3</sub>*) in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 113–118
- [16] He J P, Ke L P, Hong D F, Xie Y Z, Wang G C, Liu P W, Yang G S. Fine mapping of a recessive genic male sterility gene (*Bnms<sub>3</sub>*) in rapeseed (*Brassica napus*) with AFLP and *Arabidopsis* derived PCR markers. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 11–18
- [17] Dun X, Zhou Z, Xia S, Wen J, Yi B, Shen J, Ma C, Tu J, Fu T. BnaC.Tic40, a plastid inner membrane translocon originating from *Brassica oleracea*, is essential for tapetal function and microspore development in *Brassica napus*. *Plant J*, 2011, 68: 532–545

## 欢迎订阅 2013 年《华北农学报》

《华北农学报》1986 年创刊, 由河北、北京、天津、河南、山西、内蒙古六省市区农科院、农学会联合主办, 为全国首家跨省、市、区多单位联办的农业学术刊物。本刊立足华北, 面向全国和全世界。主要刊载农业各学科的学术论文、研究报告以及科研简报, 报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

《华北农学报》为中国科学引文数据库核心期刊(CSCD 核心库)、中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊和中国农业核心期刊。2011 年的《中国期刊引证报告》(扩刊版)中《华北农学报》影响因子达到 2.253, 被引频次 3950 次, 基金论文比 98%, 学科排名全国第 2 位, 成为全国有代表性的农业学术刊物。同时, 《华北农学报》多次荣获国家级及省级奖励: 全国优秀科技期刊评比三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、首届“北方十佳期刊奖”、河北省“十佳期刊奖”及河北省优秀期刊奖等奖项; 2011 年被评为“中国精品科技期刊”和“河北省荣誉期刊”。

《华北农学报》国内外公开发行, 国内统一刊号: CN 13-1101/S, 国际刊号 ISSN 1000-7091。双月刊, 双月 28 日出版, 国际标准大 16 开本, 240 页, 每期定价 12 元, 全年 72.00 元。邮发代号: 18-10, 国外发行代号: 5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅, 请写清刊名、份数、收刊人姓名、地址、邮编, 以免误投或无法投递。

地址: 河北省石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部, 邮编: 050051

电话: 0311-87652166 E-mail: hbnxb@163.com 网址: <http://www.hbnxb.net/>