

改良型 Ogu-NWSUAF CMS 油菜的生物学特征

常建军^a, 胡胜武^a, 赵惠贤^b, 李占杰^b

(西北农林科技大学 a 农学院; b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**分析细胞质雄性不育油菜 Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜不育系的异同,并筛选其恢复系。**【方法】**比较了苗期、花期、成熟期 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜植株形态上的差异;以 Ogu-NWSUAF CMS 为母本,以国内外 130 份油菜品种(系)为父本,测定 Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜恢保关系的异同;采用石蜡切片法从细胞水平上研究二者花药败育时期的特征;利用位点特异 PCR 法,研究二者在分子水平上的差异。**【结果】**Ogu-NWSUAF CMS 油菜叶色正常、蜜腺发育良好、雄蕊败育彻底、天然结实性好,其综合性状优于 Ogu CMS 油菜;Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜的恢保关系不同,鉴定出了 2 份 Ogu-NWSUAF CMS 油菜的恢复系;Ogu-NWSUAF CMS 油菜花药发育受不育基因的影响较晚,能分化出 4 个花粉囊,小孢子败育于单核期;在 Ogu-NWSUAF CMS 油菜中能同时扩增出 Ogu 系统和 Nap 系统的特征片段。**【结论】**Ogu-NWSUAF CMS 油菜克服了 Ogu CMS 油菜的黄化缺绿现象,雄蕊败育彻底,天然结实性更好,与 Ogu CMS 油菜的恢保关系不同,二者在细胞和分子水平上均存在差异。

[关键词] 油菜; Ogu-NWSUAF CMS; Ogu CMS; 恢保关系; 细胞学; 分子特征

[中图分类号] S565.401

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)04-0071-08

Characteristics of an improved Ogu-NWSUAF CMS in *Brassica napus* L.

CHANG Jian-jun^a, HU Sheng-wu^a, ZHAO Hui-xian^b, LI Zhan-jie^b

(a College of Agronomy, b College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: **【Objective】**This study was carried out to reveal the differences between the Ogu-NWSUAF CMS line and the Ogu CMS line in *Brassica napus* L., and to screen out the restorers for Ogu-NWSUAF CMS. **【Method】**We compared morphological differences between the Ogu-NWSUAF CMS line and the Ogu CMS line in seedling, flowering and maturity stage. Restoring and maintaining relationship of the Ogu-NWSUAF CMS line and the Ogu CMS line was tested by 130 rapeseed accessions. Anther abortion of both lines was observed by paraffin section method. Molecular characteristics of both lines was revealed by site-specific PCR method. **【Result】**The Ogu-NWSUAF CMS line restored etiolation of the Ogu CMS line, had normal nectary, and its stamen still aborted thoroughly. The restoring and maintaining relationship of the Ogu-NWSUAF CMS line and the Ogu CMS line was different, two restorers for the Ogu-NWSUAF CMS line were identified. The Ogu-NWSUAF CMS line could form four microdiodanges. Pollen abortion of the Ogu-NWSUAF CMS line belonged to the uninucleate abortion type. Molecular characteristics by gene-specific PCR showed that the Ogu-NWSUAF CMS line could amplify both Ogu CMS system specific gene-orf138 product and Nap CMS system specific gene-orf 222 product. **【Conclusion】**The Ogu-NWSUAF CMS

* [收稿日期] 2009-10-13

[基金项目] 国家油菜产业技术体系岗位科学家项目(nycyt-x-00505); 陕西省科技攻关项目(2007K01-05); 西北农林科技大学青年科研骨干项目

[作者简介] 常建军(1982—), 男, 山西潞城人, 硕士, 主要从事油菜遗传育种研究, 现在陕西咸阳市农业科学研究所工作。

[通信作者] 胡胜武(1966—), 男, 陕西柞水人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事油菜遗传育种研究。

E-mail: swhu8325@yahoo.com.cn

line restored etiolation of the Ogu CMS line, and its stamen still aborted thoroughly. The Ogu-NWSUAF CMS line had different restoring and maintaining relationship with the Ogu CMS line. There existed some differences between them at the cellular and molecular level.

Key words: *Brassica napus* L.; Ogu-NWSUAF CMS; Ogu CMS; restoring and maintaining relationship; cytology; molecular characteristic

油菜是我国乃至全世界最主要的油料作物之一,存在着显著的杂种优势,其中细胞质雄性不育(Cytoplasmic male sterility, CMS)是生产油菜杂交种的主要授粉控制系统之一。目前,我国生产上使用的甘蓝型油菜杂交种中,其不育胞质基本上来自 Pol 系统(或陕 2A)^[1-2]。Pol 胞质雄性不育系的发现和利用,极大地促进了中国油菜的研究和生产,然而,由此带来的大面积推广品种细胞质单一化的趋势,将成为杂交油菜持续性发展的限制因素^[3]。因此,在油菜杂优育种中,发现、培育和利用新的细胞质雄性不育类型,是具有更为深远意义的基础工作。

目前,国内外已报道的油菜细胞质雄性不育系统较多^[1-2]。Ogura^[4]发现,萝卜 Ogu CMS 不育性十分稳定、彻底。Bannerot 等^[5]采用回交的方法,将 Ogu CMS 导入甘蓝型油菜中,育成了 Ogu CMS 甘蓝型油菜不育系,该不育材料不育性相当稳定,到目前为止在芸薹属内未发现其恢复基因,且在低温下叶片黄化、蜜腺发育不良,影响昆虫传粉^[6]。因此,对 Ogu CMS 油菜进行改良并筛选其恢复系,是利用该类不育材料进行杂优育种的关键。

西北农林科技大学油菜研究中心生物技术育种课题组在 Ogu CMS 油菜的基础上,选育出一种苗期叶片不缺绿、蜜腺正常、雄蕊育性退化非常彻底的甘蓝型油菜不育系,命名为 Ogu-NWSUAF CMS。本研究拟从遗传学、细胞学和分子学水平上,综合分析比较 Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 的异同,以期 Ogu-NWSUAF CMS 在油菜杂种优势育种中的利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Ogu CMS 油菜引自中国农业科学院油料作物研究所。Ogu-NWSUAF CMS 材料是先将 Ogu CMS 油菜与甘蓝型油菜连续回交多代,然后与大白菜连续回交 5 代后,再与甘蓝型油菜回交 6 代而选育出的新型油菜不育材料。Ogu CMS(7B0060)和 Ogu-NWSUAF CMS(7B0021)均为甘蓝型油菜自交系 7B0302 材料回交保持。

Ogu CMS 和 Ogu-NWSUAF CMS 恢保关系测定所用的 130 份油菜品种(系),均由西北农林科技大学油菜研究中心生物技术育种课题组提供。这 130 份油菜材料按类型可分为:甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)119 份、白菜型油菜(*B. rapa* L.)9 份、芥菜型油菜(*B. juncea* L.)1 份、埃塞俄比亚芥(*B. caranita* L.)1 份。按来源可分为:中国材料 70 份、美国材料 25 份、捷克材料 18 份、乌克兰材料 7 份、德国材料 2 份、瑞典材料 1 份、加拿大材料 7 份。以上材料中有 Pol CMS(陕 2A)的保持系、恢复系, Nap CMS 的保持系以及显性核不育系 Shaan-GMS^[7]的恢复系等。

细胞质类型分子检测所用油菜材料有 7C0027(陕 2A)、7C0046(Pol CMS)、7E0133(Bronowski, Cam 细胞质)和 7E0148(Westar, Nap 细胞质)^[8]。

1.2 方法

1.2.1 植株的形态特征观察 分别在苗期、花期、成熟期,对 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜的叶色、育性、结实性进行观察并拍照记载。

1.2.2 恢保关系的测定 以 Ogu-NWSUAF CMS 油菜和 Ogu CMS 油菜为母本,分别以 130 份不同类型油菜品种(品系)为父本进行杂交,观察 F₁ 育性。

1.2.3 花药败育的细胞学观察 采用石蜡切片技术^[9],对 Ogu-NWSUAF CMS、Ogu CMS 及其保持系 7B0302 的花药发育过程进行观察。

1.2.4 DNA 的提取 油菜材料总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[10]。

1.2.5 不同细胞质类型特异基因引物的选用及 PCR 扩增 参考文献[3,11-12],分别选用 Ogu CMS、Nap CMS 和 Pol CMS 的不育相关基因 *orf138*、*orf222*、*orf224* 的特异引物(引物序列及信息见表 1),对 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜进行细胞质类型的分子检测。

PCR 反应体系为 20 μ L,其中包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8, 25 $^{\circ}$ C), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L 4 种 dNTP (Promega, USA), 正反向引物各 0.5 μ mol/L, 1.0 U

EX *Taq* DNA (Takara Biotech. Co., Dalian, China), 50 ng 基因组 DNA。

表 1 不同位点特异 PCR 引物的序列及信息

Table 1 Site-specific PCR primers used in the present investigation

引物编号 Primer No.	引物序列(5'-3') Primer Sequence (5'-3')	基因上结合位置(登录号) Gene location (No. in GenBank)	扩增产物 长度/bp Size expected	目的基因 Target gene	细胞质类型 Cytoplasm type	参考文献 Reference
P51	GAAACGGGAAGTGACAATAC	987~1 006(gi:14385)	465	Orf138	Ogu CMS	[11]
P52	GCATTATTTTCTCGGTCCAT	1 451~1 432(gi:14385)				[12]
P11	AGCTGTCTGGAGGGAATC	526~543(gi:257558)	1 777	orf224/atp6	Pol CMS	[3]
P22	ATAACACTACTCTCATCCCTCG	2 302~2 281(gi:257558)				
P11	AGCTGTCTGGAGGGAATC	4 114~4 131(gi:1800190)	1 093	orf222/nad5c	Nap CMS	[3]
P42	GCGGTCTCACGCACTAATC	5 206~5 188(gi:1800190)				

PCR 循环条件为:首先 94 ℃ 预变性 2 min;然后 94 ℃ 变性 30 s, 54 ℃ 退火 50 s, 72 ℃ 延伸 70 s, 共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min, 4 ℃ 保存。

1.2.6 PCR 扩增产物的检测 PCR 扩增产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色 10~20 min, 用 Pharmacia 公司 Image Master CDS 凝胶成像系统检测照相。

2 结果与分析

2.1 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜植株的形态特征

苗期,Ogu-NWSUAF CMS 油菜植株叶片呈正常绿色(图 1A),Ogu CMS 油菜植株幼叶黄化,但是老叶叶色较深(图 1B)。

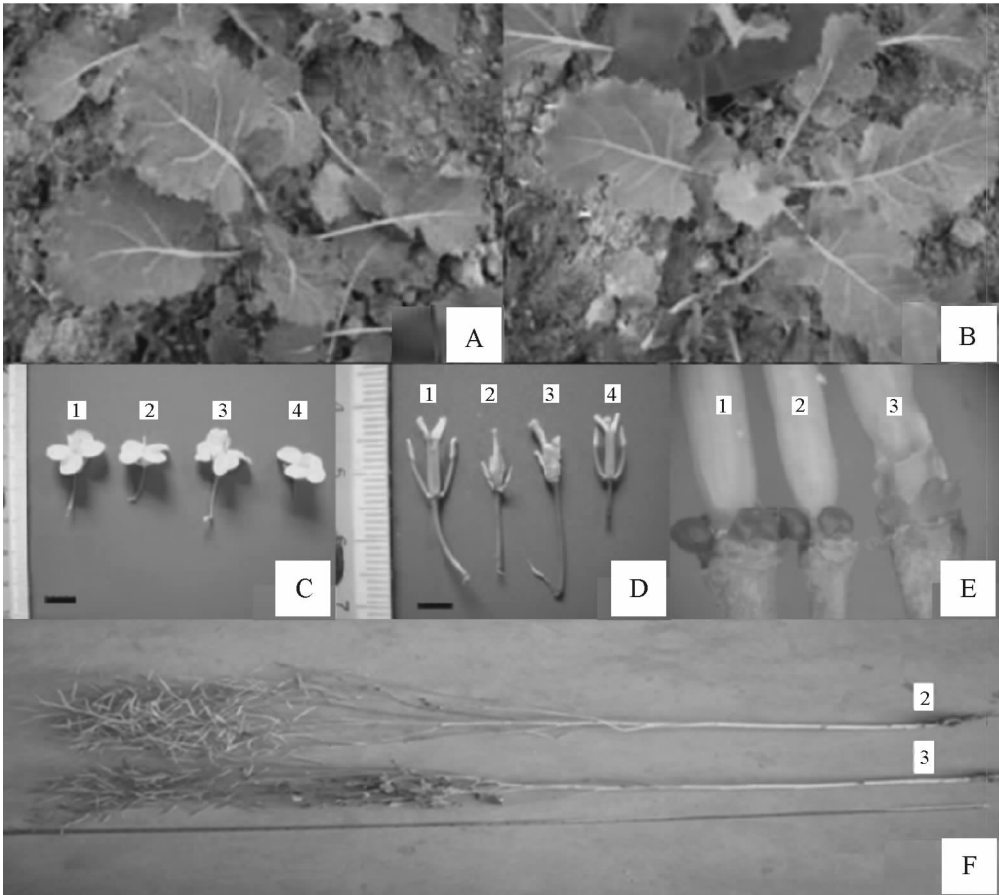


图 1 Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜形态特征的比较

A. 苗期 Ogu-NWSUAF CMS 油菜;B. 苗期 Ogu CMS 油菜;C. 花瓣;D. 花粉;E. 蜜腺;F. 结实性;
1. 保持系材料 7B0302;2,4. Ogu-NWSUAF CMS 油菜;3. Ogu CMS 油菜;标尺=5 mm

Fig. 1 Comparison between the Ogu-NWSUAF CMS line and the Ogu CMS line

A. Ogu-NWSUAF CMS seedling;B. Ogu CMS seedling;C. Petal;D. Pollen;E. Nectary;F. Seed-setting;
1. Maintainer 7B0302;2,4. Ogu-NWSUAF CMS;3. Ogu CMS; Bar=5 mm

花期,保持系材料 7B0302 的花器官发育正常(图 1 C1、D1、E1); Ogu-NWSUAF CMS 油菜花瓣较保持系略小,但不皱缩(图 1 C2、C4),大部分不育花 6 枚雄蕊都退化明显(图 1 D2),少部分不育花花丝退化不明显(图 1 D4),但 6 枚花药干瘪、瘦小,都呈三角形干枯,表面颜色显白,没有花粉,蜜腺的形态、颜色与其保持系相同(图 1 E2); Ogu CMS 油菜花瓣大小与其保持系无明显差别,但皱缩明显(图 1 C3),雌蕊异常膨大,四强雄蕊的花丝退化变形消失、花药心皮化,没有花粉,二弱雄蕊的花丝存在,花药干瘪、瘦小,呈丝状,也没有花粉(图 1 D3),蜜腺的形态、颜色与其保持系存在差异,其颜色较浅(图 1 E3)。

成熟期, Ogu-NWSUAF CMS 油菜天然结实率高(图 1 F2),而 Ogu CMS 油菜较低(图 1 F3)。

综上所述, Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜植株形态上存在着差异。

2.2 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜的恢保关系

2006 至 2008 年,连续 3 年测定了 130 份材料对 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜的恢保关系。结果表明, Ogu-NWSUAF CMS 油菜与其中 128 份材料的测交后代雄性不育, 2 份材料与 Ogu-NWSUAF CMS 油菜的测交后代育性恢复(图 2), 这 2 份材料是从加拿大引进的材料 04H998 后代中分离得到的; Ogu CMS 油菜与 130 份材料的测交后代均雄性不育。

上述结果表明, Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜的恢保关系不同。

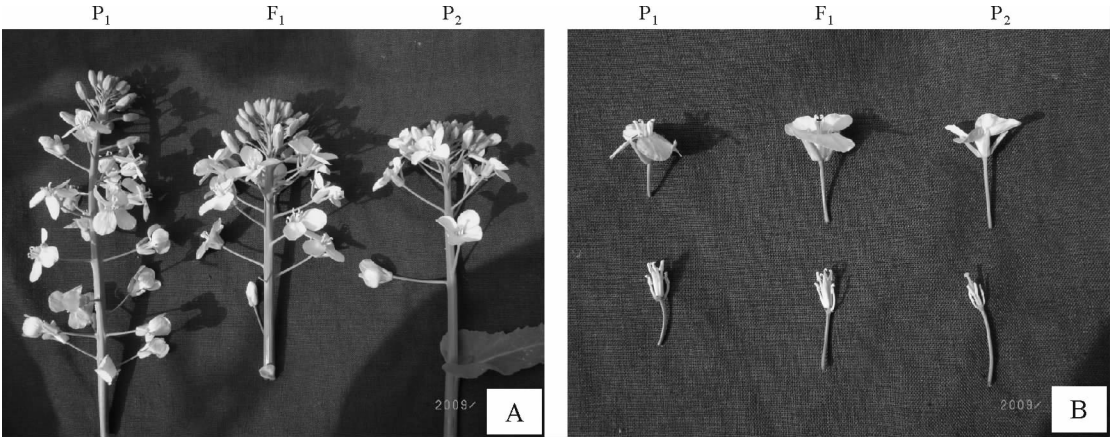


图 2 Ogu-NWSUAF CMS、恢复系 7B01F-1 及其 F₁ 的育性表现
A. 花序; B. 花; P₁. 恢复系 7B01F-1 P₂. Ogu-NWSUAF CMS; F₁. P₁ 与 P₂ 的杂种
Fig. 2 Fertility expression of the identified restorer for Ogu-NWSUAF CMS and their F₁ progeny
A. Inflorescence; B. Flower; P₁. The restorer 7B01F-1; P₂. Ogu-NWSUAF CMS; F₁. Hybrid between P₁ and P₂

2.3 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜花药败育的细胞学观察

用石蜡切片法,对 Ogu-NWSUAF CMS、Ogu CMS 油菜及其保持系 7B0302 的花药发育过程进行观察。结果表明,保持系 7B0302 的花药发育与前人报道基本相同,包括花粉母细胞时期、减数分裂期、单核期、双核期、三核期、成熟花粉期,并且花药横切面的 4 个角隅处都有药室发育。

Ogu-NWSUAF CMS 油菜的花药能分化出呈蝴蝶形的 4 个花粉囊,在四分体形成前,其花药发育与对应保持系的花药没有明显不同(图 3A~F);进入单核期以后,由于绒毡层细胞液泡化程度高,径向伸长,使小孢子细胞被挤压浓缩成一团,随着绒毡层细胞的细胞质逐渐解体,小孢子细胞由于被挤压不

能正常发育而先浓缩后破裂,花粉囊成为包含无细胞结构残留物的变形空腔(图 3G~J)。

Ogu CMS 油菜花药横切面只有 2 个角隅处有药室发育(图 4A~C)。在小孢子母细胞时期, Ogu CMS 油菜有的角隅向花药室发育,有的角隅则向心皮的方向发育(图 4G)。Ogu CMS 油菜个别药室中的小孢子可发育到四分体时期,其四分体形态基本正常,外被胼胝质壁,但释放困难,持续时间长(图 4D、E)。进入单核期,小孢子细胞质变薄、液泡化,核变形、不分裂解体(图 4F);绒毡层细胞解体消失,整个花药成空壳状并收缩干瘪(图 4I、J)。同时,还观察到一些花药角隅外周细胞伸长,内部细胞进行有丝分裂,使角隅膨大(图 4H);此外还存在雄蕊雌蕊化现象(花药心皮化)。

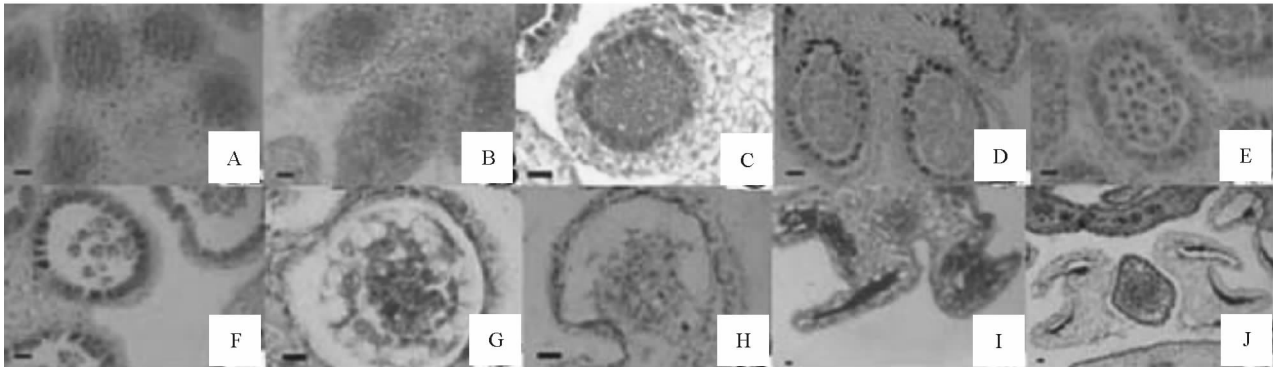


图 3 Ogu-NWSUAF CMS 油菜花药发育的切片观察

A. 孢原细胞时期;B. 初生造孢时期;C. 次生造孢时期;D. 花粉母细胞时期;E. 后期 I ;F. 四分体时期;G. 单核期;
H. 单核后期;I. 药室败育;J. 药室完全败育;标尺=0.02 mm

Fig. 3 Anther development of the Ogu-NWSUAF CMS line

A. Archesporial cell stage;B. Primary sporogenous cell stage;C. Secondary sporogenous cell stage; D. Pollen mother cell stage; E. Metaphase I ;F. Tetrad stage;G. Uninucleate stage;H. Late uninucleate stage;I. Abortion of anther chamber;J. Thoroughly abortion of anther chamber;Bar=0.02 mm

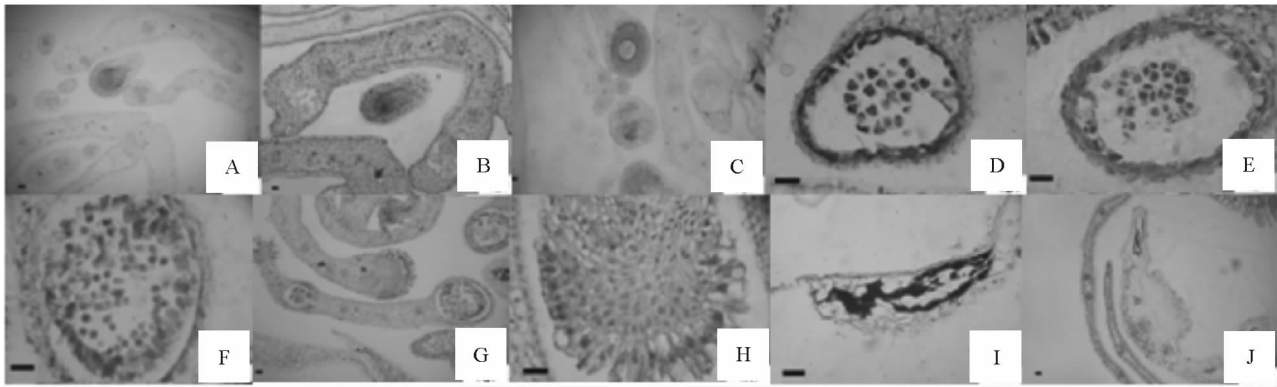


图 4 Ogu CMS 油菜花药发育的切片观察

A. 孢原细胞时期;B. 造孢细胞时期;C. 花粉母细胞时期;D. 后期 II ;E. 四分体时期;F、G. 单核期;H. 花药雌化;
I. 败育;J. 完全败育;标尺=0.02 mm

Fig. 4 Anther development of the Ogu CMS line

A. Archesporial cell stage;B. Sporogenous cell stage;C. Pollen mother cell stage;D. Anaphase II ;E. Tetrad stage;
F,G. Uninucleate stage;H. Pistilliod-stamen;I. Abortion of anther chamber;J. Thoroughly abortion of anther chamber;Bar=0.02 mm.

总之,Ogu-NWSUAF CMS 油菜花药发育受不育基因的影响较晚,花药能分化出 4 个花粉囊,小孢子败育于单核期,由绒毡层细胞径向伸长挤压所致;而 Ogu CMS 油菜花药发育受不育基因的影响较早,出现花药心皮化,药室发育不全。

2.4 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜细胞质类型的分子鉴定

油菜细胞质雄性不育与其线粒体上特定的基因表达有关^[13]。关于 Ogu CMS、Pol CMS 和 Nap CMS 等细胞质类型的不育相关基因及其特异引物已有报道^[8,14]。本研究利用前人报道的这些细胞质类型不育相关基因的特异引物,分别对 Ogu-NW-

SUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜细胞质类型进行分子特征鉴定,结果见图 5。由图 5 可以看出,利用 Ogu CMS 油菜特有的不育相关基因 *orf138* 特异引物,在 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜中均扩增出大小约为 470 bp 的产物(图 5A 泳道 1 和 2);而在其他材料中均未扩增出产物(图 5A 泳道 3~7)。利用 Pol CMS 材料特有的不育相关基因 *orf224* 与其相邻基因 *atp6* 序列的特异引物,即 *orf224/atp6* 基因特异引物,在细胞质类型为陕 2A 和 Pol CMS 的材料中均扩增出约 1 800 bp 的片段(图 5B 泳道 4 和 6);而在其他材料中均无此扩增产物(图 5B 泳道 1~3、5、7)。利用 Nap CMS 材料特

有的不育相关基因 *orf222* 与其相邻基因 *nad5c* 序列的特异引物,即 *orf222/nad5c* 基因特异引物,在 Ogu-NWSUAF CMS 和 Nap 中均能扩增出约为 1 100 bp的目的片段(图 5C 泳道 1,7);而在其他材料中均未扩增出此目的产物,但扩增出约为 500 bp 的片段(图 5C 泳道 2~6)。以上结果表明,用 Ogu CMS 特有基因 *orf138* 的特异引物,在 Ogu CMS 和 Ogu-NWSUAF CMS 油菜中均扩增出了其独有的 470 bp 特征目的条带;用 Nap 细胞质特异基因 *orf222/nad5c* 的特异引物除在 Nap 细胞质类型油

菜中扩增出大小约 1 100 bp 的特征带外,还在 Ogu-NWSUAF CMS 油菜中扩增出了同样长度的特征带。为了明确 *orf138* 的特异引物在 Ogu CMS 和 Ogu-NWSUAF CMS 油菜中扩增的约 470 bp 目标片段,以及 *orf222/nad5c* 的特异引物在 Ogu-NW-SUAF CMS 和 Nap 细胞质类型油菜中扩增的约 1 100 bp目标片段的异同,对上述 2 对扩增产物分别进行测序,结果表明其序列完全相同,且与 Genbank 报道的序列一致(gi:14385,gi:1800190)。

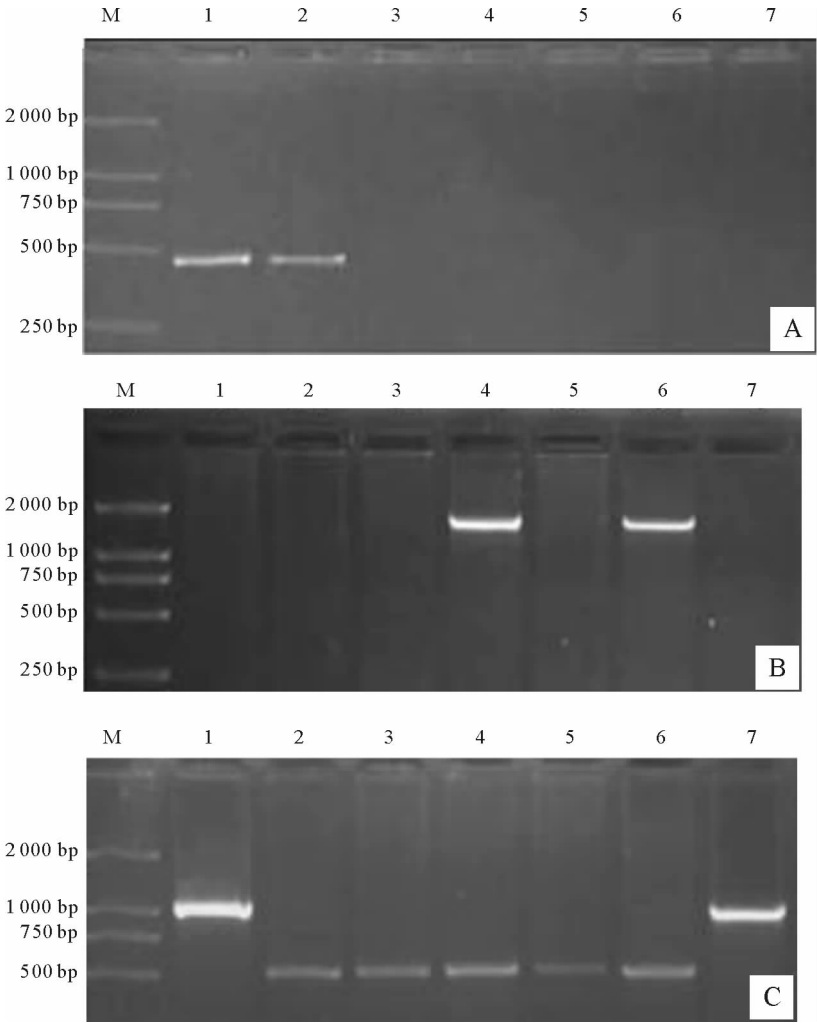


图 5 Ogu-NWSUAF CMS 和 Ogu CMS 油菜细胞质类型的分子检测

A. *orf138* 特异引物;B. *orf224/atp6* 特异引物;C. *orf222/nad5c* 特异引物;M. Mark;1. 7B0021(Ogu-NWSUAF CMS);2. 7B0060(Ogu CMS);3,5. 7E0133(Bronowski, Cam 细胞质);4. 7C0027(陕 2A);6. 7C0046 (Pol CMS);7. 7E0148(Westar, Nap 细胞质)

Fig. 5 Molecular identification of cytoplasmic type of the Ogu-NWSUAF CMS line

A. Electrophoresis pattern of PCR products amplified with the specific primer for *orf138*;B. With the specific primer for *orf224/atp6*;C. With the specific primer for *orf222/nad5c*;M. Mark;1. 7B0021(Ogu-NWSUAF CMS);2. 7B0060(Ogu CMS);3,5. 7E0133(Bronowski, Cam); 4. TC0027(Shaan 2A);6. TC0046(Pol CMS);7. 7E0148(Westar, Nap)

总之, Ogu-NWSUAF CMS 既有 Ogu CMS 油菜特有的 *orf138* 特征带,又有 Nap 细胞质特有的

orf222 特征带,说明 Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜在分子水平上(mtDNA)存在差异。

3 讨 论

3.1 Ogu CMS 油菜的创制及其研究现状

Ogu CMS 甘蓝型油菜不育系的不育性相当稳定,是油菜杂优育种中具有利用潜力的细胞质雄性不育类型之一,且目前在油菜中尚未发现其恢复基因,但是 Ogu CMS 在低温下叶片缺绿黄化、蜜腺发育不良,影响昆虫传粉,限制了其在油菜杂优育种中的利用。对 Ogu CMS 油菜材料进行改良以及筛选 Ogu CMS 的恢复系,一直是国内外油菜育种者的工作重点。与 Ogu CMS 油菜相比,本研究小组创制的 Ogu-NWSUAF CMS 油菜不育性也非常稳定,且具有叶片不黄化缺绿、多代回交后生长势不退化、天然结实性好等优点。本研究分别测定了 Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜的恢保关系,用于测交的亲本材料包括甘蓝型油菜、白菜型油菜、芥菜型油菜和埃塞俄比亚芥,这些材料中有 Pol CMS (陕 2A) 的保持系和恢复系、Nap CMS 的保持系及显性核不育系 Shaan-GMS 的恢复系等,具有广泛的代表性。结果发现,Ogu-NWSUAF CMS 油菜的恢保关系与 Ogu CMS 油菜不同,从 130 份测交亲本中,鉴定出了 2 份 Ogu-NWSUAF CMS 油菜的恢复系。前人研究表明,Ogu CMS 油菜小孢子败育受温度的影响,低温下(18/15 ℃,昼/夜),雄蕊完全皮化;中温下(23/28 ℃,昼/夜),小孢子可发育到四分体时期;高温(27/23 ℃,昼/夜)下,小孢子可发育到小孢子时期^[15-17]。Ogu-INRA CMS 油菜小孢子败育是由于绒毡层细胞未成熟死亡,处于液泡期的小孢子缺乏有功能的线粒体所致^[18-19]。本研究观察发现,Ogu CMS 油菜花药发育受不育基因的影响较早,出现花药心皮化,药室发育不全;而 Ogu-NWSUAF CMS 油菜花药发育受影响较晚,花药能分化出 4 个花粉囊,小孢子败育于单核期,由绒毡层细胞径向伸长挤压所致。

在大白菜、甘蓝等食用营养体的植物中,可以直接利用 Ogu-NWSUAF CMS 选育杂交种。然而对于以种子为产品的油菜,首先需要筛选到它的恢复系,其才能在油菜杂优育种中得到广泛应用。法国农业科学院的科学家通过染色体工程技术,将萝卜中的恢复基因转移到油菜中,通过分子标记等技术选育出了优良的 Ogu-INRA CMS 恢复系^[20],然而该材料受到了有关专利的保护。将我国萝卜中存在 Ogu CMS 的恢复基因^[21],通过染色体工程技术导入到油菜中,可望选育出具有自主知识产权的油菜

恢复系。本研究从 130 份测交亲本中,鉴定出了 2 份 Ogu-NWSUAF CMS 油菜的恢复系,为 Ogu-NWSUAF CMS 在油菜杂种优势育种中的应用奠定了基础。

3.2 Ogu-NWSUAF CMS 油菜的分子特征

油菜细胞质雄性不育(CMS)与线粒体上特定基因的表达有关^[13],开放阅读框 *orf138* 引起芸薹属 Ogu CMS 不育^[22],*orf224* 引起 Pol CMS 不育^[13],*orf222* 引起 Nap CMS 不育^[8]。本研究结果显示,Ogu-NWSUAF CMS 油菜既有 Ogu CMS 特有的 *orf138* 基因的扩增条带,又有 Nap 细胞质特有的 *orf222* 基因的扩增条带,说明 Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜在分子水平上存在差异。

4 结 论

本研究从植株形态、遗传(恢保关系)、细胞和分子水平上对 Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜进行了比较分析,结果表明,Ogu-NWSUAF CMS 不育性稳定,叶色不出现黄化缺绿现象,天然结实性好;其恢保关系与 Ogu CMS 不同,从 130 份测交亲本中,鉴定出了 2 份 Ogu-NWSUAF CMS 油菜的恢复系;Ogu-NWSUAF CMS 油菜花药能分化出 4 个花粉囊,小孢子败育于单核期,主要原因是绒毡层细胞径向伸长挤压所致;Ogu-NWSUAF CMS 与 Ogu CMS 油菜在分子水平上存在差异。

致谢:西北农林科技大学园艺学院柯桂兰研究员惠赠了大白菜 Ogu CMS 材料,于澄宇博士参加了油菜 Ogu-NWSUAF CMS 的前期转育工作,新疆农科院陈跃华研究员惠赠了材料 04H998,特此一并感谢!

[参考文献]

- [1] 傅廷栋. 杂交油菜的育种与利用 [M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1999:1-5,42-70.
Fu T D. Breeding and utilization of hybrid rapeseed [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1999: 1-5, 42-70. (in Chinese)
- [2] 沈金雄,万正杰,景兵,等. 油菜细胞质雄性不育及恢复的分子机理研究进展 [J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(3): 374-383.
Shen J X, Wan Z J, Jing B, et al. Progress on molecular mechanisms of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rapeseed [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(3): 374-383. (in Chinese)
- [3] 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.
Wei W L, Wang H Z, Liu G H. Molecular identification of the

- sterile cytoplasm of NCa of a cytoplasmic male sterile line in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(10): 1965-1972. (in Chinese)
- [4] Ogura H. Studies on the new male sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds [J]. Mem Fac Agric Kagoshima Univ, 1968, 6(2): 39-78.
- [5] Bannerot H, Boulidard L, Gauderon Y, et al. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea* [J]. Proc EUCAPLA Meeting-Cruciferae, 1974, 25: 52-54.
- [6] Roussele P. Premiers resultats d'un programme d'introduction de l'androsterilite "Ogura" du radis chez le colza [J]. Agronomie, 1982, 2: 859-864.
- [7] 胡胜武. 甘蓝型油菜(*Brassica napus*)新型核不育材料 Shaan-GMS 的遗传及核不育的分子机制研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- Hu S W. Studies on the inheritance of the newly discovered genic male sterility accession "Shaan-GMS" and molecular mechanism of its genic male sterility in *Brassica napus* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2003. (in Chinese)
- [8] L'Homme Y, Stahl R J, Li X Q, et al. *Brassica nap* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS-associated orf224 gene [J]. Current Genetics, 1997, 31(4): 325-335.
- [9] 慕小倩. 植物显微技术 [M]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2005.
- Mu X Q. Plant microscopical technology [M]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University Press, 2005. (in Chinese)
- [10] Saghai-Maroo M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81: 8014-8018.
- [11] Giancola S, Rao Y, Chaillou S, et al. Cytoplasmic suppression of Ogura cytoplasmic male sterility in European natural populations of *Raphanus raphanistrum* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(8): 1333-1343.
- [12] Bellaoui M, Grelon M, Pelletier G, et al. The restorer Rfo gene acts post-translationally on the stability of the ORF138 Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed cybrids [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 40(5): 893-902.
- [13] Hanson M R, Bentollia S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development [J]. Plant Cell, 2004, 16(5): 154-169.
- [14] Wang H M, Ketela T, Keller W A, et al. Genetic correlation of the orf224/atp6 gene region with Polima CMS in *Brassica somatic hybrids* [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27: 801-807.
- [15] Polowick P L, Sawhney V K. A scanning electron microscopic study on the influence of temperature on the expression of cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* [J]. Canadian Journal of Botany, 1987, 65: 807-814.
- [16] Polowick P L, Sawhney V K. Microsporogenesis in a normal line and in the ogu cytoplasmic male-sterile line of *Brassica napus* L. I: The influence of high temperatures [J]. Sexual Plant Reproduction, 1990, 3: 263-276.
- [17] Polowick P L, Sawhney V K. Microsporogenesis in a normal line and in the ogu cytoplasmic male-sterile line of *Brassica napus* L. II: The influence of intermediate and low temperatures [J]. Sexual Plant Reproduction, 1991, 4: 22-27.
- [18] Gourret J P, Delourme R, Renard M. Expression of Ogu cytoplasmic male sterility in cybrids of *Brassica napus* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 83: 549-556.
- [19] Gonzalez-Melendi P, Uyttewaal M, Morcillo C N, et al. A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in Ogu-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*) [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(4): 827-838.
- [20] Primard-Brisset C, Poupard J P, Horvais R, et al. A new recombined double low restorer line for the Ogu-INRA CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genet, 2005, 111: 736-746.
- [21] 李旭锋, 李琳, 秦金红, 等. 油菜萝卜胞质雄性不育系测交后代恢复材料 F2(TC1) 的选育及细胞遗传学研究 [J]. 中国农业科学, 2001, 34(1): 108-110.
- Li X F, Li L, Qin J H, et al. Cytogenetic study on the restored material F2(TC1) from test cross progenies of *B. napus* with Ogu CMS [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2001, 34(1): 108-110. (in Chinese)
- [22] Grelon M, Budar F, Bonhomme S, et al. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica cybrids* [J]. Molecular General Genetics, 1994, 243: 540-547.