

特早熟甘蓝型油菜异交率的测定

李开祥, 杜德志

(青海大学农林科学院/青海省春油菜遗传改良重点实验室/青海省高原作物
种质资源创新与利用国家重点实验室培育基地, 西宁 810016)

摘要: 利用 SSR 分子标记技术构建 3 个特早熟甘蓝型油菜恢复系的指纹图谱, 筛选出这 3 个恢复系的共显性 SSR 标记, 测定了这 3 个恢复系的异交率。结果表明, 恢复系材料 4395、3509、4152 的异交率分别为 46.02%、33.32%、18.12%, 在 $P < 0.01$ 时呈极显著差异, 说明这 3 个恢复系的异交差异明显, 为确定这 3 个恢复系在综合杂交种中的比例提供依据。

关键词: 特早熟甘蓝型油菜; 异交率; 综合杂交种; SSR

Determination of Early Maturing *Brassica napus* L. Outcrossing Rate

LI Kai-xiang, DU De-zhi

(Qinghai Academy of Agriculture and Forestry/ Key Laboratory of Spring Rape Genetic Improvement of Qinghai Province/
National Key Laboratory Breeding Base for Innovation and Utilization of Plateau Crop Germplasm, Xining 810016)

Abstract: Fingerprinting of three very early matured *Brassica napus* restorer lines was conducted by using SSR molecular markers. Codominant SSR markers were found in the 3 restorer lines and their F_1 . Those primers were used to determine the outcrossing rate of these 3 restorer lines in fields. The results showed that the outcrossing rate of these restorer lines (4395, 3509, and 4152) were respectively 46.02%, 33.32%, and 18.12%. There was a significant difference at 0.01 level, which illustrated that the outcrossing rate of three restorer lines had differences. And it provided a basis to determine the proportion of three restorer lines in synthetic hybrids.

Key words: *Brassica napus* L.; outcrossing rate; synthetic hybrids; SSR

利用杂种优势是提高油菜产量和品质最有效的途径, 其中综合杂交种是油菜杂种优势利用的途径之一。综合杂交种是将多个自交系或品系混合, 通过系间相互杂交配合的杂种。1952 年, 瑞典种子协会把来源不同的芜菁油菜 (*Brassica rape* L.) 品系混合在一起种植, 合成一个混合的 F_1 群体^[1]。这是第 1 个实际意义的综合杂交种。1972 年, 英国 Thompson 把来自德国、波兰、瑞典的 15 个甘蓝型油菜自交系混合种在尼龙隔离棚中, 用花蝇让其充分混合授粉, 制成一个综合杂交种, 其含油量比胜利油菜高 30%^[1]。Schuster 认为, 把不同的甘蓝型油菜品系或配合力高的品种混合形成综合杂种, 具有杂种 F_1 的某些产量优势^[1]。由于植株间的异交率低 (甘蓝型油菜 10% ~ 30%), 所以综合杂种的杂种优势受

到限制。为了增加综合杂交种中杂种的比率, 选用高异交率的甘蓝型油菜自交系或品系至关重要。在植物中对异交率的研究已经很普遍, 但是, 基本上是通过表型性状^[2-3]、同工酶标记^[4]进行的。自 20 世纪 80 年代以来, 随着 DNA 分子标记的出现并已经用于一些植物异交率研究。R. Gjuri 等^[5]用 RAPD 对紫花苜蓿的杂交/自交率进行估计, 确认 RAPD 是一种对杂交/自交率进行估计的有效方法。F. Gaiotto 等^[6]用 RAPD 和 AFLP 2 种显性标记对尾叶桉的异交结实率进行估计, 研究表明 RAPD 和 AFLP 2 种显性标记对林木异交结实率的估计比同工酶标记具有实用性。K. Ritland 等^[7]、D. Zhao 等^[8]认为应用分子指纹方法以及混合交配模型可以分别估计总异交率、真实异交率和近亲异交率。夏寒冰^[9]应

收稿日期: 2013-11-30 修回日期: 2014-01-29 网络出版日期: 2014-08-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140807.1422.033.html>

基金项目: 国家油菜产业技术体系 (CARS-13)

第一作者研究方向为油菜遗传育种。E-mail: 18997174190@163.com

通信作者: 杜德志, 主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: qhurape@126.com

用 SSR 标记构建指纹图谱和混合交配模型研究杂草稻居群的异交率,通过研究了解杂草稻居群的异交率及其变异,剖析各个杂草稻居群的总异交率、真实异交率和近亲异交率。

由于青海脑山地区本身的气候和地理特点,油菜在该地区的生育期较短,单位面积产量低,而且单位面积用种量大。目前培育和推广的特早熟甘蓝型油菜品种都是细胞质雄性不育(CMS)三系杂交种。但是,在制种过程中作为父本的恢复系在授粉后都要割除,这使单位面积种子产量更低,制种成本提高,种子价格居高不下。使原本特早熟甘蓝型油菜品种增产所带来的收益所剩无几,妨碍了特早熟甘蓝型油菜品种在该地区的推广。青海省农林科学院提出利用综合杂交种来解决上述问题,所配制综合杂交种的亲本是由 3 个优良恢复系和 1 个不育系组成。它是在杂交种制种过程中使用多个恢复系,使恢复系不仅跟不育系杂交,而且恢复系之间相互杂交,从而形成综合杂交种。如何确定恢复系之间的比例是配制综合杂交种最关键的步骤,其中恢复系的异交率是确定恢复系之间的比例最重要的指标。本研究采用 SSR 标记构建 3 个恢复系及其杂交 F_1 的指纹图谱,同时测定 3 个恢复系的异交率,为综合杂交种的配制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为 3 个甘蓝型油菜×白菜型油菜的恢复系,分别为 4152、4395、3509,具有特早熟、花期和生育期一致等优良性状,由青海省农林科学院提供(表 1)。

表 1 品种(系)编号和名称
Table 1 Variety code and name

编号 Code	名称 Name	花期 Florescence
1	3509	5 月下旬至 6 月中旬
2	4152	5 月下旬至 6 月中旬
3	4395	5 月下旬至 6 月中旬
4	3509 × 4152	5 月下旬至 6 月中旬
5	4152 × 3509	5 月下旬至 6 月中旬
6	3509 × 4395	5 月下旬至 6 月中旬
7	4395 × 3509	5 月下旬至 6 月中旬
8	4152 × 4395	5 月下旬至 6 月中旬
9	4395 × 4152	5 月下旬至 6 月中旬

1.2 方法

1.2.1 恢复系之间杂交 F_1 的获得 2012 年 3 月将亲本材料种植在青海省农林科学院试验地,在油菜花期按照表 1 的组合进行人工授粉获得试验所需的杂交种,并按照组合分别提取亲本的总 DNA,备用。

1.2.2 用于异交率测定群体的获得 2012 年 10 月将亲本材料按拉丁方设计(表 2)种植在云南试验地,试验地是隔离的(1000 m 范围内不种油菜和十字花科蔬菜)。各材料按 1:1:1 的比例进行点播,重复 2 次。3 行为一小区,重复 7 次,共种植 21 行,进行自由授粉。2013 年 2 月按单株收获种子,各材料选 20 个单株,每单株种子发苗 96 株,按单株提取 DNA,以供测定异交率。

表 2 拉丁方设计表
Table 2 Latin square design table

行号 Line	材料名称 Name		
1	3509	4152	4395
2	4152	4395	3509
3	4395	3509	4152

1.2.3 SSR 标记

1.2.3.1 DNA 的提取 恢复系及其杂交 F_1 2012 年 9 月将表 2 材料种植在青海省农林科学院春油菜研究中心的温室中,在苗期分别取各材料(每个材料 5 株)新鲜的嫩叶约 2 cm²提取总 DNA。DNA 提取按照 Y. A. Saghai-Maroo 等^[10] 的 CTAB 法进行。

异交率测定群体 DNA 提取按照改进 M. Paris 等^[11] 的方法。具体的步骤是:取萌发幼苗放入 2 mL 的试管中,加入 100 μL 的 250 mmol/L 的 NaOH 溶液 1 min 后,加入钢珠,65 ℃ 水浴 45 min (每隔 15 min 摇 1 次),之后放到 mill 磨碎,倒出钢珠,加入 6 倍体积的 TE 缓冲液(80 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 值 7.5)稀释中和,即得到 DNA 样品,用于 PCR 试验之前先离心(8000 rpm, 5 min),取 3 μL 作为 DNA 模板。

1.2.3.2 分子标记 SSR 标记参照 B. Saal 等^[12] 方法进行,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,共 113 对,采用 10 μL PCR 体系。PCR 扩增产物用 6% PAGE 胶展示。分别统计各样本的 SSR 扩增条带,有带记为 1,无带记为 0。

1.2.4 数据处理 异交率 = 杂种单株数/检测总株数。方差分析采用 SPSS 软件进行。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

对 3 个恢复系及其杂交 F_1 用 113 对 SSR 引物进行筛选,为使试验材料基因组 DNA 反映整个群体的遗传背景,本试验采用 5 个单株 DNA 等量混合的基因池。剔除无扩增条带、扩增效果较差、扩增条带模糊、特异性较差的引物,获得 14 对在 3 个恢复系及其杂交种之间有明显差异片断的引物。其中互为正反交的杂交种条带一致,所以认为互为正反交的杂交 F_1 在分子水平上没有差异。

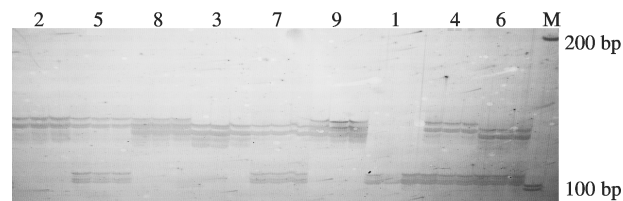
2.2 指纹图谱的构建

用筛选的 14 对 SSR 引物对 3 个恢复系及其杂交 F_1 材料进行检测(图 1)。结果共检测到 80 条清晰的条带,每条引物扩增的位点为 2 ~ 11 个,其中多态性条带 73 条,平均每对引物 5.2 条,多态性比率为 91.25%。

表 3 3 个恢复系及其杂交 F_1 材料的数字指纹图谱

Table 3 Figure fingerprints of 3 restorer lines and its hybrid F_1 materids

引物 Primer	位置 Location	名称 Name								
		4152	4395	3509	3509 × 4395	4395 × 3509	3509 × 4152	4152 × 3509	4152 × 4395	4395 × 4152
SSR5	121	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	125	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	170	1	1	0	1	1	0	0	1	1
	175	1	0	1	1	1	1	1	1	1
SSR38	100	0	0	1	1	1	1	1	0	0
	120	0	1	0	1	1	0	0	1	1
	123	1	0	0	0	0	1	1	1	1
	130	0	1	0	1	1	0	0	1	1
	135	1	0	0	0	0	1	1	1	1
P002	153	1	0	1	1	1	1	1	0	0
	189	0	0	1	1	1	1	1	0	0
	200	0	1	0	1	1	0	0	1	1
	205	1	1	0	1	1	1	1	1	1
SSR61	186	0	1	0	0	0	0	0	1	1
	190	0	1	0	0	0	0	0	1	1
	200	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	263	1	0	0	1	1	1	1	1	1
	267	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	269	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	272	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	275	0	0	1	1	1	1	1	0	0
	290	1	1	0	1	1	0	0	0	0
	170	1	1	0	1	1	0	0	1	1



1 ~ 9 为样品编号,同表 1

1 - 9 were the numbers of varieties as table 1

图 1 引物 SSR38 对 3 个恢复系及其杂交 F_1 材料的扩增图谱

Fig. 1 Amplified profile of 3 restorer lines and its hybrid F_1 materials by SSR primer SSR38

通过 14 对 SSR 引物对 3 个恢复系及其杂交 F_1 扩增产物的分析可知,每对 SSR 引物对 3 个恢复系及其杂交 F_1 的分辨能力是不同的,其中引物 SSR38、SSR61 可以一次性分辨 3 个恢复系及其杂交 F_1 ,是共显性引物。其他引物需要多条引物组合才能将 3 个恢复系及其杂交 F_1 区分开,根据构建的数字指纹图谱(表 3),引物 P002、SSR5 组合可以完全将 3 个恢复系及其杂交 F_1 区分开。

为了能快速简便地区分不同材料,本试验还制作了具有直观、方便等优点的单个材料的指纹图谱,弥补了数字指纹图谱在实际应用中的不足(图2)。

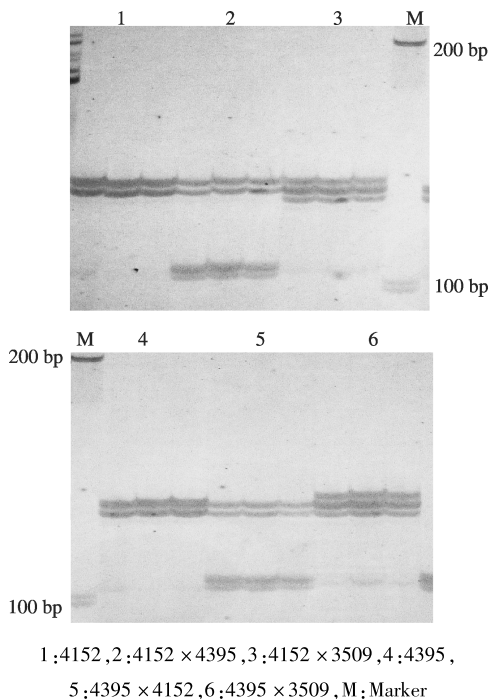


图2 恢复系4152、4395及其杂交F₁的指纹图谱
Fig.2 Fingerprints of restorer line 4152,4395,and their F₁

2.3 异交率的测定

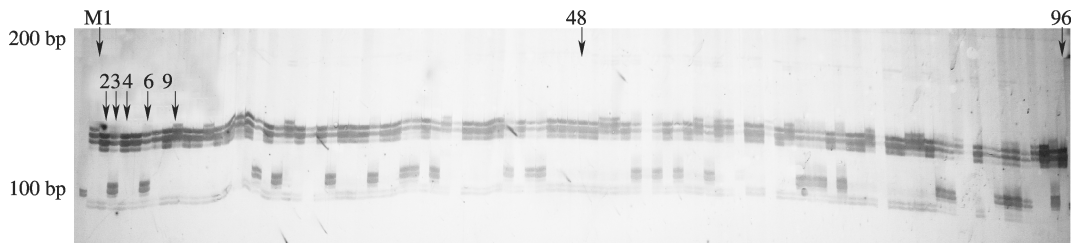
2.3.1 SSR引物一致性验证及共显性标记 选用3个恢复系及其杂交F₁各10个单株的DNA,用指纹

图谱构建过程中得到的具有共显性标记的SSR引物SSR38、SSR61扩增,进行一致性验证,获得共显性、稳定性和重复性好的SSR共显性标记SSR38(表4)。

表4 SSR38共显性扩增谱带
Table 4 Band sites of PCR amplification using SSR38 primer

位置 Location	扩增位点 Sites of PCR amplification					
	4152	4395	3509	4395 × 3509	4152 × 3509	4152 × 4395
100	0	0	1	1	1	0
120	0	1	0	1	0	1
123	1	0	0	0	1	1
130	0	1	0	1	0	1
135	1	0	0	0	1	1
153	1	0	1	1	1	0

2.3.2 SSR分子标记测定异交率 每个亲本材料选择20个单株的种子进行发苗,用引物SSR38对云南收获的每个单株种子萌发的96株苗的扩增产物进行检测,如图3是对恢复系4395材料13号单株种子96株苗的扩增产物进行的检测,检测结果为:有45株为母本带型(如2、4号);有29株为4395×3509杂种带型(如3、6号);有18株为4395×4152杂种带型(如1、9号),测定的恢复系4395材料13号单株异交率为51.09%。



1~96为单株编号,每隔48个写一个编号,M:Marker
1-96 were the numbers of varieties. One number was remarked forty-eight numbers. M:Marker
图3 SSR38对恢复系4395材料13号单株种子萌发96株苗的扩增产物带型

Fig.3 Amplified pattern of 96 plants of No.13 restorer line 4395 with SSR primer SSR38

根据所测得的3个恢复系材料的异交率数据可知:恢复系3509材料20个单株的异交率变幅为19.97%~42.68%,平均异交率为33.32%,在所检测的萌发苗中杂种3509×4152占24.15%、杂种3509×4395占9.18%;恢复系4152材料20个单株的异交率变幅为6.52%~32.26%,平均异交率为18.12%,在所检测的萌发苗中杂种4152×3509占11.30%、杂种4152×4395占6.82%;恢复系4395

材料20个单株的异交率变幅为33.72%~68.54%,平均异交率为46.02%,在所检测的萌发苗中杂种4395×3509占29.61%、杂种4395×4152占16.41%。

对3个材料的异交率进行新复极差测验,从结果可以看出恢复系材料3509、4152、4395间的异交率差异达到极显著(表5),方便确认各恢复系材料异交率优势强弱。

表 5 Duncan's 新复极差多重比较结果

Table 5 Comparison of Duncan's multiple range

名称	异交率(%)	1% 极显著水平
Name	Outcrossing rate	A significant level of 1%
4395	46.02 ± 2.06	A
3509	33.32 ± 1.39	B
4152	18.12 ± 2.17	C

3 讨论

3.1 分子标记在异交率测定中的应用

本研究采用 SSR 标记构建了 3 个恢复系及其杂交 F₁ 的指纹图谱,并建立了方便直观的单个材料指纹图谱,为 3 个恢复系异交率的测定提供了方便、快捷的技术体系。从指纹图谱建立过程中筛选出一致性、稳定性和重复性好的共显性标记 SSR38,能更方便地鉴别杂种和自交种以及杂种父本的恢复系。前人研究表明,分子标记较表型性状、同工酶标记等方法更具有实用性,不仅方便、快捷而且也不易受环境、季节和其他因素的影响^[6-9]。例如本研究若用表型性状来测定各材料的异交率是很困难的,不仅要寻找合适的指示性状而且易受环境、季节因素的影响,并且浪费人力财力。

3.2 亲本基因型对异交率的影响

从本研究所测得的 3 个恢复系材料的异交率数据可以看出,各组合杂种对其对应亲本的异交率影响是不同的,其中组合 4395 × 3509 的杂种对材料 4395 的异交率影响最大,其次依次是组合 3509 × 4152、4395 × 4152、4152 × 3509、3509 × 4395、4152 × 4395。从中不难看出无论以同一材料作母本或父本,其杂种对异交率的影响均有较大差异。这说明亲本的基因型对材料异交率影响比较大。前人研究表明,甘蓝型油菜的异交率与亲本基因型有关^[13-16]。

3.3 各材料异交率的分析

从所测得的 3 个恢复系材料的异交率数据可以看出,恢复系材料 4395 的异交率最高为 46.02%,3509 次之为 33.32%,4152 最低为 18.12%。甘蓝型油菜是常异花授粉作物,异交率一般在 10% ~ 30%^[1,17]。恢复系材料 4395 和 3509 的异交率已超过 30%,这可能与材料的背景有关^[18],这些材料都是来源于甘白杂交,部分与异交率相关的白菜型油菜遗传成分导入到了甘蓝型油菜,造成了这些材料的异交率要高于一般的甘蓝型油菜,这说明甘白杂交能丰富甘蓝型油菜的遗传基础^[19-20]。对各材料

的异交率进行方差分析,3 个恢复系材料之间的异交率呈极显著差异,说明 3 个恢复系的异交率明显存在差异。通过对 3 个恢复系材料异交率的测定,为确定综合杂交种中恢复系材料的比例提供依据。

参考文献

- [1] 傅廷栋. 杂交油菜的育种和利用[M]. 武汉:湖北科技文化出版社,2000:163-164
- [2] 孙志强. 大豆天然异交率的测定[J]. 中国油料作物学报,1992(3):13-17
- [3] 浦惠明,傅寿仲,戚存扣,等. 甘蓝型双低“三系”杂交油菜高产制种技术研究 II. MICMS 双低不育系宁 A6 的自然异交率[J]. 江苏农业科学,1998(6):22-24
- [4] 郑健,郑勇奇. 花楸树天然群体的异交率[J]. 林业科学,2009,45(11):40-49
- [5] Gjurić R, Smith S R. Identification of cross-pollinated and self-pollinated progeny in Alfalfa through RAPD nulliplex loci analysis[J]. Crop Sci,1996,36:389-393
- [6] Gaiotto F A, Bramucci M, Grattapaglia D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet,1997,95:842-849
- [7] Ritland K, Jain S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n indepent loci[J]. Heredity,1981,47:35-52
- [8] Zhao R, Xia H, Lu B R. Fine-scale genetic structure enhances biparental inbreeding by Promoting mating events between more related individuals in wild soybean (*Glycine soja*; Fabaceae) Populations[J]. Am J Bot,2009,96(6):1138-1147
- [9] 夏寒冰. 异交率、遗传结构和种子萌发揭示的杂草稻适应进化[D]. 上海:复旦大学,2010
- [10] Saghai-maroo M A, Soliman K M, Joergensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1984,81:8014-8018
- [11] Paris M, Carter M. Cereal DNA: a rapid high-throughput extraction method for marker assisted selection (protocols) [J]. Plant Mol Biol Rep,2000,18:357-360
- [12] Saal B, Plieske J, Hu J, et al. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica* II. assignment of rapeseed microsatellite to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L. [J]. Theor Appl Genet,2001,102(5):695-699
- [13] 李琳,蓝泽通,陈祥荣,等. 影响甘蓝型油菜与诸葛菜远缘杂交结实率的几个因素[J]. 中国油料,1997,19(4):5-6
- [14] 刘晓霞. 甘蓝型油菜杂交亲和性的研究[J]. 湖南农业科学,2007(5):39-41
- [15] 刘忠松. 油菜远缘杂交的遗传育种研究 II. 芥菜型油菜与甘蓝型油菜杂交亲和性的杂种一代[J]. 中国油料,1994,16(3):1-5
- [16] Rashid A, Rakow G, Downey R K. Development of yellow seeded *Brassica napus* through interspecific crosses[J]. Plant Breeding,1994,112:127-134
- [17] 孙超才,赵华,方光华. 甘蓝型油菜异花授粉率研究初报[J]. 上海农业科技,1995(2):21-22
- [18] 徐东旭,姜翠棉,宗绪晓. 蚕豆种质资源形态标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(4):399-406
- [19] 杜德志,姚艳梅,胡琼,等. 新型特早熟春性甘蓝型油菜的遗传多样性及其杂种优势[J]. 中国油料作物学报,2009,31(2):114-121
- [20] 钱伟. 甘蓝型油菜与白菜型油菜亚基因组间杂种优势的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2003