

文章编号:1001-4829(2008)03-0586-04

体细胞组织培养用于甘蓝型油菜核三系 保持系绵7MB-1亲本繁殖与F₁制种的研究

蒙大庆,袁代斌,张跃非,郭子荣,胥 岚,
李芝凡,蒲定福,汤天泽,贺启川,陈 军

(四川绵阳市农业科学研究所,四川 绵阳 621023)

摘要:利用自育的核三系临保系新材料绵7MB-1,可以将油菜绵7AB类型、S45AB类型等隐性核不育两用系的不育株率从50%提高到90%以上。针对该材料在自交繁殖过程中,发生部分育性回复的现象,采用临保系植株茎段体细胞组织培养技术,实现了绵7MB-1的批量繁殖,将繁殖的临保系苗用于网室亲本不育系繁制,可使不育系亲本不育株率达到91.7%~93.5%。每繁制公顷不育系亲本,可供7500~15000 hm²杂交F₁的制种生产使用。用高不育率不育系代替原核不育两系进行制种,大大减少了用工,同时使制种产量显著提高,制种质量也更有保证,形成了完善的繁殖与制种体系。

关键词:甘蓝型油菜;组织培养;核三系;繁殖制种

中图分类号:S565.4 **文献标识码:**A

Study and application on reproduction of a male sterility line and F₁ hybrid line with cell tissue culture method in a new rapeseed breeding material Mian7MB-1 (*B. napus* L.)

MENG Da-qing, YUAN Dai-bin, ZHANG Yue-fei, GUO Zi-rong, XU Lan, LI Zhi-fan, PU Ding-fu, TANG Tian-ze, HE Qi-chuan, CHEN Jun
(Mianyang Institute of Agricultural Sciences, Sichuan Mianyang 621023, China)

Abstract: Using a new breeding material Mian 7MB-1, the male sterility plants rate of Mian7AB line and S45AB line could be increased more than 90%. We resolved the go-back appearance of the male sterility plants rate in inbred reproduction, and realized the batch process of Mian7MB-1 with cell tissue culture method. The sterility plants rate of the male sterility line, which was produced by the cell tissue culture method reached 91.67% - 93.5%. We could reduce production costs and increase yield of F₁ hybrid evidentially, and in the future we can stand guarantee for the quality of F₁ seeds.

Key words: *B. napus* L.; cell tissue culture; GMS three-line; reproduction

绵阳市农业科学研究所利用自育的绵1AB-1核不育两系进行不育系转育的过程中,发现一些材料后代自交育性分离差异很大,通过连续针对不育率性状进行选择,从绵1AB-1×品87-161-134的自交后代中培育出了一个自交不育株率达到50%以上,兄妹交和与其他隐性核不育两系(绵9AB-1、S45AB等)测交的不育株率达90%以上的核三系临保系新材料绵7MB-1。遗传规律表明,该材料育性受核内2对隐性不育基因和1对以上育性调控基因共同控制,与陈凤祥和孙

超才报道的不育系属不同类型^[5-7]。由于育性调控基因遗传的不稳定性,使该材料在自交繁育过程中始终要出现部分自交育性分离回复到3:1,兄妹交和测交育性分离回复到1:1的现象,这使得该不育材料在制种生产中的应用受到制约。为此,本文作者提出了利用体细胞组织培养技术,对临保系绵7MB-1进行茎段培养,从而避免由于自交重组发生部分后代育性回复的现象,达到批量扩繁临保系,进而繁制出足量不育系亲本供杂交制种使用的目的。目前对油菜核不育两系中的不育株进行组织培养的已有报道^[1-4],而本文系选取隐性核三系不育系的临保系为组培对象,尚未见类似报道。

收稿日期:2007-04-29

基金项目:“十一五”四川省农作物育种攻关;“十一五”四川省联合育种攻关经费资助项目

作者简介:蒙大庆(1969-),男,高级农艺师,主要从事油菜选传育种研究。

1 材料与方法

1.1 材料

核三系临保系:绵 7MB-1。

核两系不育系:绵 7AB-4-1。

恢复系:绵恢 9613 及品 93-496(引自四川省农业科学院)。

1.2 方法

1.2.1 油菜体细胞快繁试验操作流程 2004 ~ 2005 年春,在田间选择绵 7MB-1 可育株若干个,在开花前取幼嫩茎段分别进行体细胞组织培养。所选单株同时分别套袋自交,并分别与绵 7AB-4-1 中的不育株进行测交,测交 F₁ 和自交 F₁ 均进行夏繁育性鉴定。根据鉴定结果,在所选单株中确定 1~2 个不育率高、综合性状好的单株进行组培扩繁。

组培流程:取临保系绵 7MB-1 幼嫩茎段,室内无菌水冲洗,75%酒精灭菌 8 s,再用 0.1%升汞灭菌 10 min,切为 1~2 mm 厚的苔片,接种于诱导培养基中。在 25℃,2000 lx 光照下培养 20 d。当每个苔片上长出 2~4 个小芽后,转移至增殖培养基进行扩繁增殖,增殖系数为 9。

诱导培养基: B5 + 谷氨酰胺 2 mg/L + 水解乳蛋白 50 mg/L + 6-BA 2 mg/L + 2T 1 mg/L。

增殖培养基: MS + 6BA 1mg/L + NAA 0.1mg/L。

1.2.2 研究不同繁殖方式对不育株率的影响 利用绵 7MB-1 快繁苗和自交繁育苗同时分别在网室大棚中隔离繁殖核三系不育系绵 7MA-1,对比两种繁殖方式对后代不育系不育株率的影响。

1.2.3 三系杂交 F₁ 与两系杂交 F₁ 的品种比较试验 配制绵 7AB-4-1 × 品 93-496、绵 7AB-4-1 × 绵恢 9613 等绵油 12、17 的两系杂交 F₁,配制(绵 7AB-4-1 × 绵 7MB-1) × 品 93-496、(绵 7AB-4-1 × 绵 7MB-1) × 绵恢 9613 等绵油 12、17 的三系杂交 F₁,对两种杂交 F₁ 做随机区组试验,分析丰产、抗病和农艺性状等方面的差异。

1.2.4 三系法与两系法制种的比较试验 利用繁殖的核三系不育系绵 7MA-1 和两系不育系绵 7AB-4-1 同时在制种区安排制种试验,分析核三系法制种与两系法制种在制种产量、用工成本、综合效益方面的差异。

2 结果与分析

2.1 临保系绵 7MB-1 植株的组织培养

绵 7MB-1 植株的组培开始于 2002 年,于 2004 年正式用临保系苗的批量繁殖。2004 年对田间中选的 6 个绵 7MB-1 单株进行茎段组织培养,各单株均获得了可供批量扩繁的组培苗。这 6 个单株同时进行了田间套代保种和配制相应核三系不育系绵 7MA-1,夏收后对所收种子进行夏繁鉴定,通过对育性、抗病性和农艺性状的综合考察,确定了 2 个单株用于扩繁,共扩繁出临保系绵 7MB-1 组培苗 20000 余苗。

如表 1 所示,绵 7MB-1 可将绵 7AB-4-1 不育系不育率提高到 90% 以上,但在绵 7MB-1 自交分离后代中会出现少量育性分离回复到两系不育系状态(自交育性分离 3:1,兄妹交和测交育性分离 1:1)的现象。通过夏繁鉴定可有效鉴别这部分植株,对符合要求的临保系组培苗再进行试验室内的扩繁,不符合要求的予以淘汰。

2.2 利用临保系繁殖高不育率的核三系不育系

2004、2005 年秋利用临保系绵 7MB-1 的组培苗进行不育系繁殖。首先是组培苗的练苗、寄栽,在幼苗 2~3 叶时寄栽到精整后的苗床地中,用遮阳网加以遮光保护,待苗成活后,逐渐去掉网布,后期管理与普通油菜相同。苗龄 30 d 左右开始移栽入繁殖大田。

繁殖田按照母本(绵 7AB-4-1):父本(绵 7MB-1) = 4:1 的比例种植,公顷种植密度 135 000 苗左右。在花前搭建隔离网罩,初花前田间鉴定育性,及时拔除母本行绵 7AB-4-1 中约 50% 的可育株,再放入蜜蜂进行辅助授粉,终花后拆除网罩。

表 1 通过夏繁鉴定的绵 7MB-1 自交与相应测交后代绵 7MA-1 育性表现

Table 1 Fertility expression of Mian7MB-1 inbred and it's combinations F₁ Mian7MA-1

株号 Code	绵 7MB-1 自交 Mian7MB-1 inbred			绵 7MA-1 (即绵 7AB-4-1 × 绵 7MB-1) Mian 7MA-1 (Mian7AB-4-1 × Mian7MB-1)		
	总株数 Total	不育株数 No. of sterility plant	不育率(%) Sterile rate	总株数 Total	不育株数 Sterility	不育率(%) Rate
M040142-1	89	45	50.6	92	85	92.4
M040142-2	90	63	70	89	86	96.6
M040142-3	91	48	52.7	90	84	93.3
M040142-4	91	22	24.1	90	46	51.1
M040142-5	90	60	66.7	90	87	96.7
M040142-6	90	71	78.8	90	89	98.9

表2 临保系不同繁殖方式对后代不育系不育株率的影响

Table 2 The sterility rate of the plants of different culture method

年份 Year	材料名称 Name of material	繁殖方式 Culture method	总株数 Total	不育株数 No. of sterile plant	不育株率(%) Sterile rate
2003	7AB-4-1 × 7MB-1	自交 Inbred	3037	1938	63.8
	7MB-1	自交 Inbred	1022	573	56.1
2004	7AB-4-1 × 7MB-1	组培 Cell tissue culture	5579	5216	93.5
	7MB-1	组培 Cell tissue culture	1106	0	0
2005	7AB-4-1 × 7MB-1	组培 Cell tissue culture	9783	8967	91.7
	7MB-1	组培 Cell tissue culture	3852	0	0

表3 两系杂交 F₁ 与三系杂交 F₁ 的综合比较Table 3 The comparison of two-line crossing F₁ and three-line crossing F₁

品种名称 Variety		产量 (kg/667m ²) Yield	单株角果数 Pods per plant	角粒数 Seeds per pod	千粒重(g) Weight of 1000-seeds	株高(m) Plant height	全生育期(d) Days	菌核病指 Disease index
绵油 12 Mianyou 12	两系 Two-line	182.11	600.3	12.49	3.36	212.3	226	0.97
	三系 Three-line	184.39	677.1	11.76	3.28	215.5	226	2.58
绵油 17 Mianyou 17	两系 Two-line	181.89	646.8	11.56	3.38	215.8	226	2.55
	三系 Three-line	190.00	656.9	12.14	3.31	213.4	226	1.27

通过试验发现,2003 年用自交繁殖的临保系进行核三系不育系繁殖,0.5 hm² 共收不育系种子 525 kg,不育株率为 63.8% (表 2);2004 年 2 hm² 不育系繁殖获得不育系种子 1470 kg,夏繁鉴定不育株率达到 93.5%;2005 年 6 hm² 不育系繁殖获得不育系种子 3000 kg(受土壤肥力及蜂群强度影响,产量不理想),夏繁鉴定不育株率达到 91.7%。说明采用体细胞繁殖临保系苗,能够克服临保系自交后的育性回复现象,使繁殖出的核三系不育系的不育株率稳定达到 90% 以上。

2.3 两系杂交 F₁ 与三系杂交 F₁ 的品种比较试验

从丰产性上看,利用核三系法配制的三系杂交 F₁ 与两系杂交 F₁ 相比,产量相当或略好(表 3)。产量构成因素中除单株角果数略有增加外,角粒数和千粒重变化不大,其他农艺性状如株高、全生育期等均无明显差异,抗病、抗寒性也无明显差异。因此可以认为,利用临保系繁殖核三系不育系,进而配制核三系杂交 F₁ 取代两系杂交 F₁ 是完全可行的。

表4 两系法制种与三系法制种的部分生产成本比较

Table 4 The cost comparison of two-line and three-line reproduction

制种方式 Method	亲本种子 成本(元) Parents seeds	移栽用工 (元) Transplanting	去杂用工 (元) Removing the fertility plants	合计(元) Total
两系法 Two-line	4	40	60	104
三系法 Three-line	5.2	32	10	47.2

2.4 利用绵 7AB-4-1 进行两系法制种和利用绵 7MA-1 进行三系法制种的对比分析

2.4.1 节本增效 核两系不育系绵 7AB-4-1 的不育株率多年田间调查稳定在 48% ~ 52%,在制种过程中需要花费大量人工在初花前拔除母本行中约 50% 的可育株,工作量大,时间紧,不利于制种质量的控制^[8]。利用核三系不育系绵 7MA-1 代替核两系不育系后,虽仍需拔除可育株,但工作量只有原来的 1/5。据调查统计,采用两系不育系制种,拔除可育株的用工在 30 ~ 45 个工/hm²,采用三系不育系则只需 7.5 个工/hm²,仅此一项就可降低成本约 750 元/hm²。另外,由于三系不育系不育株率高,拔除的可育株很少,在制种技术上,种植密度也相应减少,从两系不育系密度的 150 000 株/hm² 降到了 105 000 ~ 120 000 株/hm²。这样既可减少用种量,田间工作量也相应减少。

2.4.2 提高制种产量 对近 150 000 hm² 绵油 12 和绵油 17 油菜制种区连续几年的调查统计表明,两系法由于受拔除 50% 可育株的影响,制种产量一般只有 750 ~ 1200 kg/hm²。采用三系法制后,产量一般在 1440 ~ 2250 kg/hm²,农户每公顷制种收益相当于种植 2 hm² 普通油菜籽的效益,农户制种的积极性大大提高,制种技术的落实更加有效,制种的质量也更有保证。

3 讨论

绵 7MB-1 临保系不仅可使绵 7AB-3-1、绵 7AB-

4-1 等核两系的不育株率提高到 90 % 以上,也可使 S45AB 等同类型隐性核不育两系的不育株率提高到 90 % 以上。利用三系法制种可以克服两系法拔除大量可育株的麻烦,大幅降低用工量,并显著提高制种产量,为隐性核不育系的应用展现了广阔的前景。对绵 7MB-1 的遗传规律研究发现,绵 7MB-1 自交遗传具有不稳定性,目前最有效的克服方式就是体细胞组织培养。通过体细胞培养,一方面可以保持临保系苗的基因型不发生改变,确保测交后代不育株率稳定达到 90 % 以上,另一方面由于临保系组培苗群体基因型的高度一致性,使临保系组培苗全为可育株,不再象自交繁殖后代那样会发生育性分离,从而可以为母本不育株提供足够的花粉,有利于提高繁制产量。

采用组织培养繁殖临保系也存在一些问题,一是亲本不育系的繁殖成本较高,一般每公顷不育系繁制约需 30 000 苗临保系组培苗,其生产成本大约为 30 000 ~ 45 000 元,按每公顷收 1500 kg 不育系种子计算,每公顷大田制种的不育系种子成本将多增加 15 ~ 30 元。这只有通过不断完善组培技术,进一步降低组培成本来解决。如寻找可替代的廉价药品试剂,以及摸索如何进一步提高出苗率等。另外一个问题是,组培苗由于在组培过程中使用各种生

长激素,加之从 3 月田间取样到 9 月中旬才寄栽,组培苗在试管中生长时间很长,在移入大田后普遍出现生育期提前的现象,年前就会开花。为使繁制中父母本花期相遇,可适当调整播期。母本由于是大田兄妹交的后代,可适当推迟播种。父本由于是来自实验室组培,可在苔期通过割苔推迟开花期。

参考文献:

- [1] 石淑稳. 组织培养技术在油菜育种中的应用[J]. 农业世界, 2000 (8).
- [2] 赵云. 油菜核雄性不育油菜无性繁殖研究 I 细胞核不育油菜试管繁殖[J]. 中国油料作物学报, 1997(1): 1-5.
- [3] 林呐. 组织培养技术在油菜育种中的应用研究进展[J]. 渝西学院学报(自然科学版), 2005(2): 14-18.
- [4] 黄先群. 甘蓝型油菜核不育组织培养快速繁殖[J]. 植物生理学报通讯, 1995(2): 61-64.
- [5] 陈凤祥. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育性的遗传研究 - I 隐性打核不育系 9012A 的遗传[J]. 作物学报, 1998(4): 431-438.
- [6] 孙超才. 甘蓝性油菜隐性核不育系 20118A 的遗传与利用探讨[J]. 中国油料作物学报, 2002(4): 1-4.
- [7] 蒙大庆. 双低甘蓝型油菜新型核不育系绵 7AB-4 的遗传研究 I. 育性表现的初步研究[J]. 四川农业大学学报, 2004(1): 24-28.
- [8] 罗传浩. 两系杂交油菜制种高质高产技术[J]. 中国种业, 2003 (1): 34.

(责任编辑 李洁)