

芥菜型油菜和白菜型油菜种间杂种遗传分析

牛 妍, 赵志刚, 余青兰, 星晓蓉, 杜德志

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

摘要: 种间杂交是一种拓宽栽培作物遗传基础和转移优良性状的重要手段, 已经广泛地用于作物品质的改良。本研究通过芥菜型油菜 (*Brassica juncea* L.) 和白菜型油菜 (*Brassica rapa* L.) 种间杂交, 将芥菜型油菜的有利性状转移到白菜型油菜中, 创造新型白菜型油菜, 以改良白菜型油菜的农艺性状、提高抗逆性和拓宽其遗传基础。研究表明: 以芥菜型油菜作母本、白菜型油菜作父本的杂交组合较易获得杂交种子, 杂种 F_1 植株营养生长具有较明显的杂种优势, 但花粉完全不育; 以白菜型油菜回交获得的 BC_1F_1 植株间表型差异明显, 平均花粉可染率为 34.8%, 介于 0~84% 之间, 群体自交不亲和; BC_1F_2 和 BC_2F_1 群体变异广泛, 出现自交亲和植株和黄子植株, 平均花粉可染率分别为 79.7% 和 79.1%。

关键词: 芥菜型油菜; 白菜型油菜; 种间杂交; 细胞学

Genetic Analysis on Interspecific Hybrids Progeny between *Brassica juncea* and *Brassica rapa*

NIU Yan, ZHAO Zhi-gang, YU Qing-lan, XING Xiao-rong, DU De-zhi

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

Abstract: Interspecific hybridization is an important approach to broaden genetic base and transfer superior traits which has been widely applied for improving crops. The objectives of this study were to obtain novel *Brassica rapa* by interspecific hybridization between *B. juncea* and *B. rapa* and transfer advanced characters from *B. juncea* to improve agronomic traits and resistance of *B. rapa* and broaden its genetic base. The results showed that hybridization with *B. juncea* as the female parent and *B. rapa* as the male parent was easy to harvest hybrid seeds. F_1 plants were sterile and performed strong vegetative growth, which was backcrossed to the *B. rapa* to produce BC_1F_1 progeny. BC_1F_1 plants with great diversity of the morphology showed self-incompatible, with the average pollen stainability of 34.8%, which ranged from 0 to 84%. Self-compatible plants and pure yellow seeded plants were founded in BC_1F_2 and BC_2F_1 progeny. Moreover, BC_1F_2 and BC_2F_1 populations both showed increasing fertility level and had the average pollen stainability of 79.7% and 79.1%, respectively.

Key words: *B. juncea*; *B. rapa*; interspecific hybridization; cytology

我国种植的油菜分冬油菜和春油菜, 冬油菜主要分布在长江流域, 春油菜分布在青海、甘肃、新疆、内蒙古、西藏、四川等高纬度、高海拔地区, 常年种植面积约 73 万 hm^2 , 白菜型油菜种植面积约占 40%, 主要分布在热量条件较差、无霜期较短的高海拔地

区^[1]。白菜型油菜 (*Brassica rapa* L., AA, $2n = 20$) 为芸薹属作物二倍体基本种, 俗称小油菜, 具有多分枝、早熟、耐寒等特性, 是世界上重要的油料作物^[2]。由于白菜型油菜生育期短, 是青海省海拔 3000 m 左右的地区唯一能正常成熟的油菜栽培种。

收稿日期: 2012-10-26 修回日期: 2012-11-03 网络出版日期: 2013-06-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130619.1518.003.html>

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)前期研究(2011CB111508); “十二五”国家科技支撑计划(2011BAD35B04); 青海省应用基础研究(2011-Z-701)

第一作者研究方向为油菜分子细胞遗传学。E-mail: niuyan88@126.com

通信作者: 赵志刚, 博士, 副研究员, 研究方向为油菜分子细胞遗传学。E-mail: 13897474887@126.com

然而,白菜型油菜相比异源四倍体的甘蓝型油菜和芥菜型油菜产量低、优质资源缺乏,杂种优势利用难度大,使得品种的更新难度较大,目前生产上种植的还是 20 世纪 80 年代培育的低产、双高(高芥酸、高硫甙)常规品种,如门源小油菜、浩油 11 号、青油 241 等品种。经过长期种植,这些品种已经发生严重的种性退化,遗传基础渐趋狭窄,抗逆性明显减弱,严重阻碍了白菜型油菜产区的农民增产增收。

芥菜型油菜(*Brassica juncea* L., AABB, $2n=36$)属于十字花科芸薹属,是芥菜(*Brassica juncea*)的油用类型^[3]。芥菜型油菜起源于中国,而且新疆、青藏高原一带可能是中国芸薹属芥菜型油菜和白菜型油菜的起源地和原始分化地^[4],因此在这些地区分布着丰富的芥菜型油菜资源,而且具有生长势强、抗逆性强、抗病虫害等优良特性。芥菜型油菜是异源四倍体复合种,由二倍体祖先种白菜型油菜(*B. rapa*, AA)和黑芥(*B. nigra*, BB)杂交再加倍后进化而来^[5],其 A 基因组是由某些原始白菜型油菜提供。尽管芥菜型油菜的进化历史较白菜型油菜短暂,但是因为异源多倍体相比二倍体种更能够忍耐基因突变带来的影响而在后代中可能保留了较二倍体原始亲本更丰富的遗传变异。在长期的进化过程中,原始白菜型油菜难以寻找,但是其 A 基因组可能在异源四倍体中被保留下来。通过青藏高原芥菜型油菜品种云南炉霍本地小油菜和白菜型油菜品种青海门源小油菜种间杂交,对杂种后代辅以回交和自交,有可能把复合种中的 A 基因组部分或全部替换出来,形成新的白菜型油菜。而新的白菜型油菜在一定程度上可以说是复合种的原始供体白菜型油菜的重现,通过细胞遗传学、分子遗传学手段揭示遗传渗入的过程和状态,有利于研究白菜型油菜 A 基因组进化遗传学。

国内外芸薹属多倍化方向遗传变异的研究较多^[6-11],而从多倍体向二倍体方向转移优良性状的研究较少。种间杂交是品种间转移优良性状的重要手段,已经广泛用于改善芸薹属作物的品质^[12]。B. F. Cheng 等^[13-14]通过芥菜型油菜与双低白菜型油菜种间杂交创造了低芥酸的新型芥菜型油菜。然而,国内外通过芥菜型油菜与白菜型油菜种间杂交,创造新型白菜型油菜的研究报道较少。鉴于此,本研究拟利用芥白种间杂交,把芥菜型油菜的有利性状转移到白菜型油菜中,选育渗入有芥菜型油菜优异遗传物质的白菜型油菜新资源,拓宽白菜型油菜的遗传基础,同时通过对杂种后代辅以自交和回交,最大限度地重现白菜型油菜祖先种,探究白菜型油

菜 A 基因组的遗传和进化,从而为白菜型油菜种质创新和遗传进化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用的芥菜型油菜品种为炉霍小油菜,早熟、自交亲和;白菜型油菜品种为门源小油菜,早熟、自交不亲和。2 种材料都是高自交后代、遗传上稳定的材料,均由青海省农林科学院提供。于 2010 年 3 月种植于青海大学农科院试验田,常规栽培管理。

1.2 方法

1.2.1 杂交方法 以炉霍小油菜和门源小油菜为亲本,选择无明显病虫害、生长健壮的植株进行正反交,严格隔离去雄,获得 F_1 种子。以 F_1 为母本,用门源小油菜回交,采用重复多次授粉,得到 BC_1F_1 种子。将 BC_1F_1 种子播种后,采用回交、自交或姊妹交,直至获得遗传稳定的白菜型油菜新材料。

1.2.2 花粉的可染性 于晴好天气取当天新开的花 2 朵,取出长、短雄蕊各 1 枚,将花粉涂在玻片上,1% 醋酸洋红染色后,轻轻盖上盖玻片,在显微镜下每单株在 10 倍镜下各取 3 个视野观察、计数。大而圆且能被染成红色的为可育花粉,小而瘪且不能着色的为不育花粉。以花粉可染率表示花粉活力及育性,每个群体内随机选单株检测。

1.2.3 自交亲和指数测定 在 BC_1F_1 、 BC_1F_2 和 BC_2F_1 群体中,各随机选择若干株,进行套袋处理,套袋前去除幼蕾和已开的花,留下即将开放的蕾,待开花后(约 2 d)进行辅助授粉。记录授粉花数,成熟时统计结角数和子粒数,计算自交亲和指数。自交亲和指数 = 自交结实子粒数/授粉花朵数。以自交亲和指数来衡量自交亲和性,参照孙万仓等^[2]和范慧玲等^[15]的方法,将亲和性类型划分为自交不亲和类型(自交亲和指数 0 ~ 1.00)、自交亲和类型(自交亲和指数 1.00 ~ 4.00)和高自交亲和类型(自交亲和指数 > 4.00)。

1.2.4 细胞学观察 有丝分裂观察:田间取幼嫩花蕾,挑取子房,用 8-羟基喹啉处理 3 h 后,置于卡诺固定液(乙醇:冰醋酸 = 3:1)中固定 24 h 以上。挑取固定好的子房于 1 mol/L 的盐酸中 60 ℃ 水浴 6 min,用卡宝品红染色压片,于显微镜下观察并记录体细胞染色体数目。

减数分裂观察:田间取幼嫩花蕾置于卡诺固定液中,固定直至花蕾褪色为白色,4 ℃ 冰箱保存。挑取幼嫩花蕾的花药于 1 mol/L 的盐酸中 60 ℃ 水浴 3 min,取出后放置于清水中,然后用卡宝品红染色

压片,在显微镜下观察花粉母细胞(PMCs, pollen mother cells)的染色体行为。

2 结果与分析

2.1 F_1 遗传分析

2010年3月,在青海省农林科学院试验田,利用早熟芥菜型油菜炉霍小油菜和白菜型油菜门源小油菜进行种间正反杂交试验。以芥菜型油菜作母本、白菜型油菜作父本的正交组合获得 F_1 种子51粒, F_1 植株通过形态学和花粉育性检测,仅3株假杂种,其余均为真杂种,而以白菜型油菜作母本、芥菜型油菜作父本的反交组合获得 F_1 种子67粒, F_1 植株仅1株为真杂种。

以白菜型油菜为母本的 F_1 植株表型为中间型,营养生长强,植株高度介于父母本之间,叶裂多,分枝多,花粉完全不育。由于杂种 F_1 代仅1株为真杂种,为了充分回交授粉,细胞学未取材,无法获得细胞学数据。以门源小油菜对其回交,授粉花数约350朵,仅收获15粒种子,且种子的胚明显发育不良、干瘪,播种后均未出苗。本试验中所有芥白杂交后代均来自正交组合。

芥白 F_1 植株染色体组成为AAB, $2n = 28$ (图1A),植株表型偏芥菜型(图2C),生长旺盛,几乎达到芥菜型油菜高度,分枝少,具有明显的营养生长优势,花粉完全不育,花期长。三倍体AAB减数分裂终变期共观察109个花粉母细胞,75.2%的PMCs以10II+8I配对方式存在(图1B),染色体配对以二价体为主,二价体数目变化于6~13个,除二价体外,9.2%的PMCs还出现多价体,其中出现三价体和四价体的PMCs分别有6个和3个,另在1个细胞中出现五价体;111个中期I的PMCs中,98.2%的PMCs中都出现落后染色体,数目在2~8之间,分别凌乱地分布在赤道板两侧(图1C);180个后期I/II的PMCs,32.7%的PMCs出现落后染色体(图1E),2.2%的细胞出现染色体桥,后期I主要呈15/13分离(图1D),占观察总细胞的47.1%,其余以14/14、16/12和17/11等方式分离;处于四分体时期的PMCs观察到229个,其中出现多分孢子的占9.6%,以五分孢子为主,还出现2个六分孢子(图1F)。在三倍体AAB减数分裂过程中,B组染色体大部分以单价体存在,随机向两极运动时,由于速度缓慢,且不定向,很容易在后期I、后期II与四分体时期都出现不同数目的落后染色体、染色体桥、微核等现象,这种减数分裂的不平衡进而导致了 F_1 植株花粉的不育。

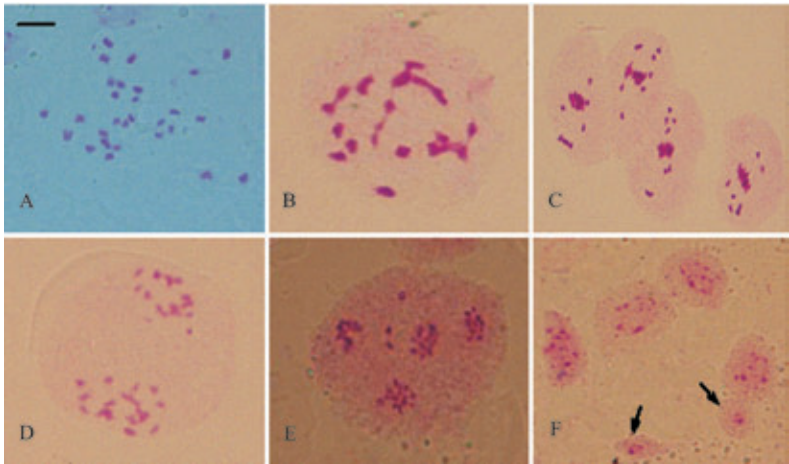
2.2 BC_1F_1 群体遗传分析

2.2.1 形态学分析 芥白杂种 F_1 花粉败育,以白

菜型油菜回交,授粉花数约2000朵,共获得28株 BC_1F_1 植株,编号为 $A_1 \sim A_{28}$ 。 BC_1F_1 植株之间形态上存在明显的差异,根据叶型、株高、花期等可以大致分为偏白菜型、中间型和偏芥菜型3种类型(图2D~F)。 BC_1F_1 植株中,偏白菜型占群体的28.6%,花期早,仅比门源小油菜晚3~5d,叶色淡绿、抱茎、表面光滑,雄蕊正常,育性较好,角果长,结实率高,子粒饱满;中间型植株占46.4%,形态介于父母本之间,基生叶颜色深绿、羽状半裂至羽状深裂、边缘有波状锯齿、叶面粗糙,茎生叶披针形、抱茎、颜色淡绿、叶面光滑,花期介于白菜型和芥菜型之间,但更接近白菜型;偏芥菜型植株占25%,茎秆粗壮,植株高大,叶羽状深裂、深绿、粗糙有颗粒状物,花期晚,雄蕊退化,育性不好,角果小,结实率低。总体来说, BC_1F_1 群体以中间型为主,偏芥菜型植株比例小于偏白菜型植株。

2.2.2 花粉可染性分析 BC_1F_1 群体平均花粉可染率为34.8%,不同单株间花粉可染率不同,介于0~84%之间(图3)。 $A_1 \sim A_8$ 偏白菜型植株,平均花粉可染率为58.5%,介于15%~84%之间; $A_9 \sim A_{21}$ 中间型植株,平均花粉可染率为32.5%,介于5%~76%之间; $A_{22} \sim A_{28}$ 偏芥菜型植株,平均花粉可染率为11.7%,介于0~63%之间。平均花粉可染率偏白菜型植株最高,其次为中间型,偏芥菜型植株最低。图3显示 A_9 、 A_{23} 、 A_{24} 、 A_{25} 、 A_{26} 、 A_{27} 等植株花粉可染率较低,其中有3株为0,完全败育,而 A_1 、 A_3 、 A_4 、 A_5 、 A_6 、 A_{10} 、 A_{13} 、 A_{22} 等植株花粉可染率都超过了60%,说明偏白菜型植株育性恢复速度明显较偏芥菜型植株快,表明B染色体组丢失越多,花粉育性恢复越快。植株 A_{22} 形态上偏芥菜型,但花粉可染率高达63%,通过花药观察发现,花粉母细胞(PMCs)染色体数目不定,确定其为混倍体,其花粉育性的恢复可能是染色体不对称加倍的结果。总体来看, BC_1F_1 群体花粉育性已经开始恢复,恢复速度偏白菜型最快,中间型次之,偏芥菜型最慢。

2.2.3 自交亲和性分析 为了检测 BC_1F_1 群体的自交亲和能力,随机选择7株进行套袋处理,待花开后进行辅助授粉,记录授粉花数,成熟时统计结角数和子粒数,计算自交亲和指数。结果如表1所示, BC_1F_1 植株的自交亲和指数变化不大,均较低,偏中间型植株 A_{17} 的自交亲和指数最高,为0.88,仍小于1,表明 BC_1F_1 群体自交不亲和。

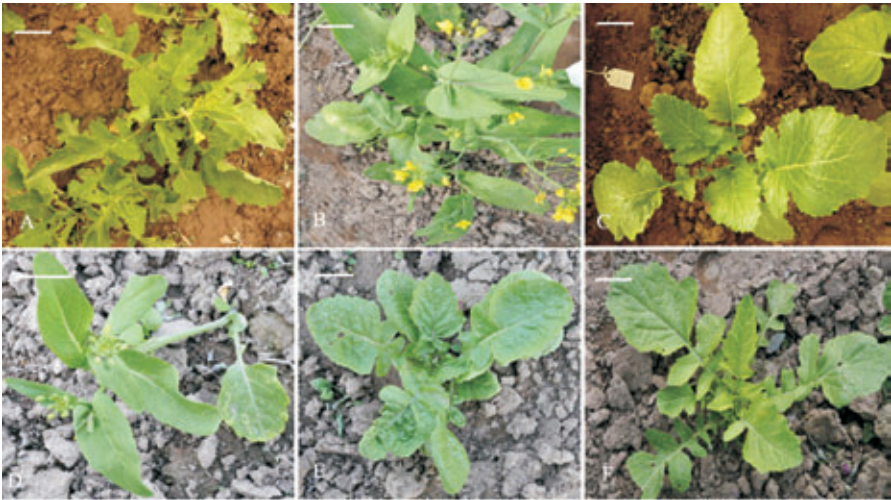


A:体细胞染色体为 28 条;B:终变期出现 10 II + 8 I ;C:中期 I 两侧出现落后染色体;
D:后期 I 15/13 分离;E:后期 II 出现滞后染色体;F:微核(1 bar = 5 μm)

A:The somatic cell with 28 chromosomes,B:A diakinesis PMC with 10 II + 8 I ,C:Some metaphase I PMCs with some chromosomes being lagging from equatorial plate,D:An anaphase I PMC with 15/13 segregation,E:An anaphase II PMC with lagging chromosomes,F:micronucleoli

图 1 F₁细胞学观察

Fig.1 Cytology observation of F₁



A:芥菜型油菜;B:白菜型油菜;C:F₁植株;D:偏白菜型;E:中间型;F:偏芥菜型 (1 bar = 5 cm)
A: *B. juncea* ,B: *B. rapa* ,C: F₁ hybrid plant,D: *B. rapa*-like,E: Intermediate,F: *B. juncea*-like

图 2 芥白杂交亲本及其杂交后代

Fig.2 The hybrids between *B. juncea* and *B. rapa* and their parents

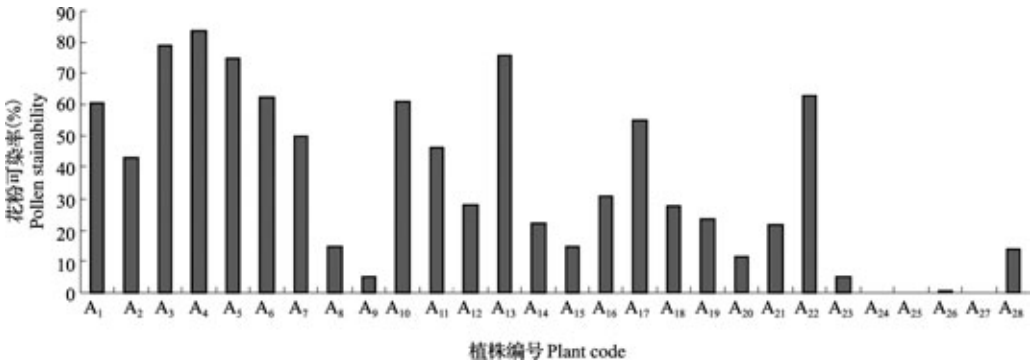


图 3 BC₁F₁植株盛花期花粉可染率

Fig.3 The pollen stainability of BC₁F₁ plants in flowering

2.2.4 细胞学研究 BC₁F₁ 植株染色体数目介于 20~54 之间,仅 A₂₂ 为混倍体,其余植株染色体在 20~28 条之间,且随着染色体数目的减少,花粉可染率增加,如表 2 所示。

表 1 BC₁F₁ 植株自交亲和指数

Table 1 Self-compatible index of BC₁F₁ plants

	植株编号 Plant code						
	A ₂	A ₃	A ₅	A ₆	A ₇	A ₁₄	A ₁₇
授粉花数	12	17	10	10	20	15	24
Flowers number							
子粒数	3	2	8	2	1	2	21
Seeds number							
亲和指数	0.25	0.12	0.80	0.20	0.05	0.13	0.88
Index of compatibility							

表 2 BC₁F₁ 植株花粉育性和染色体构型

Table 2 Pollen fertility and chromosome associations of the BC₁F₁ plants

子房染色体数目 Chromosome number of ovary	植株数目 No. of plant	花粉可染率平均值 和变化范围(%) Mean and range of pollen fertility	PMCs 数目 No. of PMCs	中期 I 平均染色体构型 Mean chromosome associations per cell in metaphase I (range in parenthesis)		
				Ⅲ	Ⅱ	Ⅰ
20	8	58(15~84)	48	—	9.96(9~10)	1.50(0~2)
23	2	39(28~46)	23	1.17(0~2)	9.39(8~10)	3.09(1~5)
24	4	29(15~55)	35	1.54(0~2)	9.66(8~11)	2.15(0~5)
25	3	15(5~28)	34	0.26(0~1)	11.18(9~12)	2.64(1~5)
26	4	12(0~22)	33	1.09(0~2)	10.88(9~12)	3.09(1~6)
28	1	0	30	0.40(0~1)	10.50(9~13)	5.30(1~8)
混倍体(20、36、44、41、54)	1	63	—	—	—	—

总细胞的 47.1%,其次为 13/13、11/15。染色体数为 28 条的植株 A₂₇,二价体数目在 9~13 之间,理论染色体构型为 10Ⅱ+8Ⅰ,而本研究中染色体构型为 0.40Ⅲ+10.50Ⅱ+5.30Ⅰ,三价体的出现和单价体的偏少表明除了 A 基因组间的同源配对外,A 基因组和 B 基因组间以及 B 基因组内可能发生了部分同源配对。

中间型植株的细胞遗传学:中间型植株细胞染色体数目在 21~25,中期 I 大部分染色体整齐地排列在赤道板上,二价体数目变化于 8~12,有 1~5 条落后染色体,后期 I/Ⅱ 分离时,出现染色体桥和滞后染色体,四分体时期出现多分孢子。

植株 A₂₂ 为混倍体,细胞学观察染色体数目为 20、36、44、41、54 等的细胞,以 44 条染色体为主,植株形态偏芥菜型,花期晚,植株高大粗壮,基生叶大且羽状深裂,茎生叶浅裂,狭长呈条状,边缘有小齿,雄蕊正常,育性较好,柱头外露,角果小,结实率低。花粉母细胞减数分裂过程中出现滞后

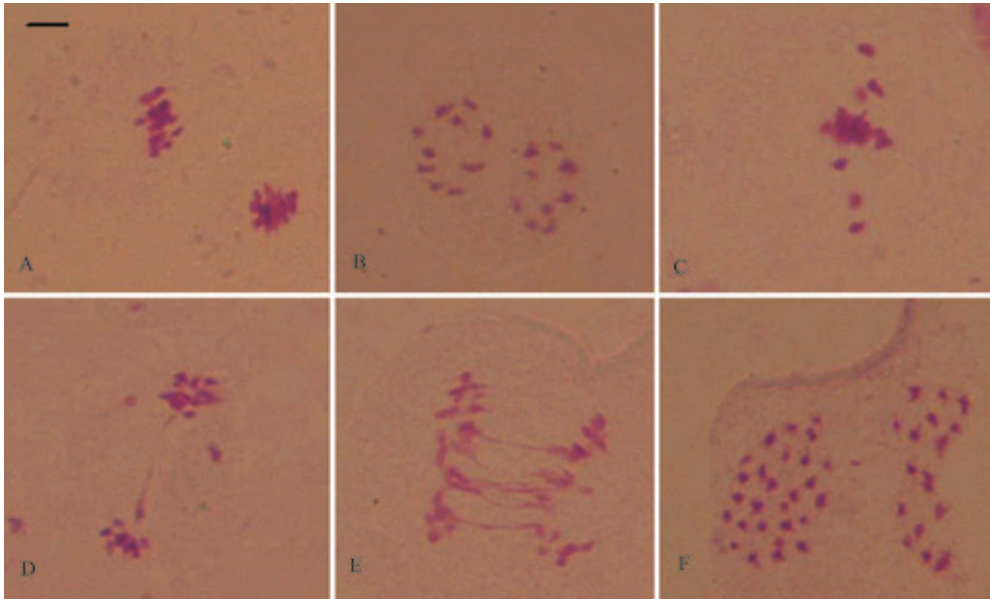
偏白菜型植株的细胞遗传学:BC₁F₁ 群体中,偏白菜型植株染色体均为 20 条。PMCs 观察发现,中期 I 染色体整齐地排列在赤道板上(图 4A),无滞后染色体和染色体桥,后期 I 观察花粉母细胞(PMCs)均以 10/10 分离(图 4B),染色体构型为 9.96Ⅱ+1.50Ⅰ,已经基本达到稳定。

偏芥菜型植株的细胞遗传学:偏芥菜型植株染色体数目在 26~28 之间,以 26 条为主。A₂₃、A₂₅、A₂₆、A₂₈ 染色体数目均为 26,中期 I 大部分染色体整齐地排列在赤道板上,二价体数目变化于 9~12 之间,两侧有 2~6 个落后染色体(图 4C),在后期 I/Ⅱ 分离时,出现染色体桥和落后染色体(图 4D),四分体时期出现微分孢子,观察到五分孢子、六分孢子、七分孢子等。后期 I 主要以 14/12 分离,占观察

染色体和染色体桥(图 4E),后期 I 不对等分裂,观察到 27/17 分离的 PMC(图 4F),四分体时期出现多分孢子。A₂₂ 植株花粉可染率为 63%,但结实较差,推测该植株可能存在较强的自交不亲和性。

2.3 BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 遗传分析

2.3.1 形态学分析 BC₁F₁ 群体可育植株自交得到 BC₁F₂ 群体共 119 株,不育植株与门源小油菜继续回交得到 BC₂F₁ 群体 67 株。BC₁F₂ 群体中,中间型占群体的 53.8%,偏白菜型植株和偏芥菜型植株分别占 34.4% 和 11.8%;BC₂F₁ 群体中,中间型占群体的 44.8%,偏白菜型植株和偏芥菜型植株分别占 26.9% 和 28.3%。BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 群体均以中间型居多,偏白菜型油菜在 BC₁F₂ 群体的比例明显较 BC₂F₁ 群体高,主要原因是自交的植株比回交的植株上一代 B 染色体丢失速度快。BC₂F₁ 群体多是由偏芥菜型的不育株和白菜型油菜回交后得到,导致偏白菜型油菜的比例较 BC₁F₂ 低。对 BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 花粉育性进行 t 测验,结果发现两群体间花粉育



A ~ B: 植株 A₁ 中期 I 10 个二价体和后期 I 10/10 分离; C ~ D: 植株 A₂₃ 中期 I 赤道板两侧出现 6 条落后染色体和后期 I 出现染色体桥;
E ~ F: 植株 A₂₂ 后期 I 出现染色体桥和后期 I 出现 27/17 分离 (1 bar = 5 μm)
A-B: A metaphase I PMC with 10 II and An anaphase I PMC with 10/10 segregation in plant A₁, C-D: A metaphase I PMC with 6 lagging
chromosomes at both sides of equatorial plate and A PMC with a chromosome bridge in anaphase I in plant A₂₃, E-F: A PMC with many
chromosome bridges in anaphase I and An anaphase I PMC with 27/17 segregation in plant A₂₂

图 4 BC₁F₁ 植株花粉母细胞
Fig. 4 PMCs of BC₁F₁ plants

性无显著差异。BC₁F₂ 共播种 15 个株系, 其中 7 个株系基本达到稳定, 株系内各单株间表型差异不明显, 另有 2 个株系分离明显, 系内单株间差异较大, 涵盖上述 3 种表现型的油菜。BC₂F₁ 共播种 9 个株系, 普遍分离明显, 每个株系至少出现 2 种表型的油菜, 其中有 3 个株系同时涵盖上述 3 种表现型油菜。BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 群体较 BC₁F₁ 群体偏芥菜型油菜植株比例均明显减少, 说明 B 组染色体持续快速丢失, 推测偏芥菜型油菜所占的比例会随着世代的增加继续降低。

BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 群体在花色、叶片形态等方面变异丰富, BC₁F₂ 群体还出现 7 株黄色子粒植株, 且子粒黄色程度不一, 对这些植株进行细胞学观察发现细胞染色体数目都接近 20 条, 且成熟较晚。

2.3.2 花粉可染性分析 BC₁F₂ 群体共调查花粉可染性 81 株, 平均花粉可染率为 79.7%, 不同单株花粉可染率不同, 介于 7% ~ 99% 之间; BC₂F₁ 群体共调查 53 株, 平均花粉可染率为 79.1%, 介于 22% ~ 95% 之间。花粉可染率低于 30% 的单株, BC₁F₂ 有 3 株, BC₂F₁ 仅 1 株, 其余单株花粉可染率都超过了 40%。BC₁F₂ 群体中 44.5% 的植株花粉可染率均超过 80%, 21% 的植株花粉育性达到亲本水平, 花粉可染率均超过 90%; BC₂F₁ 群体中 47.8% 的

植株花粉可染率均超过 80%, 超过 90% 的植株占 25.4%。BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 群体平均花粉可染率分别为 79.7% 和 79.1%, 明显较 BC₁F₁ 高, 说明 2 个群体中大部分植株花粉育性明显恢复, 仅有个别植株花粉活力很低, 需要继续回交。这是由于随着 B 染色体的连续丢失, 导致偏芥菜型油菜比例降低和偏白菜型油菜比例升高, 群体大部分植株已趋于稳定, 花粉活力也有较大程度的恢复。

2.3.3 自交亲和性分析 在 BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 中, 随机选择了 49 株植株进行自交亲和性调查, 以亲本门源小油菜和炉霍小油菜作对照。研究结果表明 BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 群体植株间自交亲和性差异较大, 亲和指数在 0 ~ 14.33 之间, 门源小油菜自交亲和指数为 0; 炉霍小油菜平均自交指数为 18.33。BC₁F₂ 群体中自交亲和植株和高自交亲和植株分别占 16% 和 19%; BC₂F₁ 群体自交亲和植株和高自交亲和植株比例均为 11% (表 3), 以上结果说明自交群体较回交群体基因渗入频率更高。

2.3.4 有丝分裂观察 在 BC₁F₂ 群体中, 通过子房观察, 确定了 41 株植株体细胞的数目, 大致分为 4 种类型: 第 1 类, 子房染色体数目为 20, 有 20 株, 占群体的 48.8%; 第 2 类, 子房染色体数目在 21 ~ 25

表 3 BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 植株自交亲和指数

Table 3 The index of self-compatibility of BC₁F₂ and BC₂F₁ progeny

类型 Type	自交亲和指数 Range of index of self-compatibility	BC ₁ F ₂ 群体	BC ₁ F ₂ progeny	BC ₂ F ₁ 群体	BC ₂ F ₁ progeny
		植株数目	所占比例(%)	植株数目	所占比例(%)
		The number of plants	Percentage	The number of plants	Percentage
自交不亲和	0 ~ 1.00	20	65	14	78
自交亲和	1.00 ~ 4.00	5	16	2	11
高自交亲和	4.00 ~ 14.33	6	19	2	11

之间,有 18 株,占 43.9%;第 3 类,子房染色体数目在 26 ~ 28 之间,仅有 1 株,占 2.4%;第 4 类,混倍体,有 2 株,占 4.9%,均来自 BC₁F₁ 植株 A₂₂,1 株观察到染色体数目为 44 和 40 的细胞,另 1 株观察到染色体数目为 36、42、44、50 的细胞,均为混倍体。

在 BC₂F₁ 群体中,通过子房观察,确定了 21 株植株体细胞的数目,大致分为 3 种类型:第 1 类,子房染色体数目为 20,有 9 株,占群体的 42.9%;第 2 类,子房染色体数目在 21 ~ 25 之间,有 11 株,占 52.4%;第 3 类,子房染色体数目在 26 ~ 28 之间,仅有 1 株,占 4.8%。

芥白杂种后代中,植株染色体条数越多,形态上越偏芥菜型,花粉育性越差。芥菜型油菜和白菜型油菜种间杂种后代染色体的稳定方向是 2n = 20,在 BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 群体中,子房染色体数目为 20 条的频率均最高,表明大部分植株已基本达到稳定,说明本研究已经初步获得新型白菜型油菜。

3 讨论

3.1 新型白菜型油菜资源的获得

利用芥菜型油菜炉霍小油菜和白菜型油菜门源小油菜分别进行正反交试验,均获得了相应的杂交种子。从杂交结实情况看,以芥菜型油菜为母本的杂交组合较易获得杂交种子,而以白菜型油菜为母本的杂交组合较难得到杂交种子,这与人^[16-19] 研究结果一致,认为油菜远缘杂交存在单向不亲和性,同一杂交组合在正反交时往往会得到不同的结果,以染色体数目多的为母本,获得杂种的几率较大。

通过对芥白种间杂交后代群体进行形态学调查、花粉可染性观察、自交亲和指数测定和细胞学等实验,已经初步获得新型白菜型油菜资源。新型白菜型油菜(AA, 2n = 20)形态上和白菜型油菜相似,花期仅晚于门源小油菜 3 ~ 5 d,但花期长于双亲花期,育性已经恢复,基本达到亲本水平,花粉可染率均大于 80%,结实率较高;对具有 20 条染色体的植株进行减数分裂观察,终变期 10 个二价体,中期 I

染色体整齐排列在赤道板中央,后期 I 均呈 10/10 分离,后期 II 四分子核染色体数目均为 10,已经达到稳定状态。新型白菜型油菜尽管染色体为 20 条,但所有染色体是否均来自 A 基因组及来源于亲本的比例尚未确定,因此下一步研究将利用分子标记 AFLP 技术确定父本遗传物质渗入频率。

目前春油菜区种植的白菜型油菜都是常规品种,进行白菜型油菜杂种优势利用研究、选育白菜型油菜杂种是提高高海拔地区油菜产量的重要措施。J. Meng 等^[20] 研究发现,渗入有白菜型油菜 A 基因组的新型甘蓝型油菜和现有的甘蓝型油菜品系组配后具有较强的亚基因间杂种优势,本研究中新型白菜型油菜 A 基因组渗入有芥菜型油菜 A 染色体甚至 B 基因组的遗传物质,与现有栽培白菜型油菜 A 基因组有较大的遗传差异,会形成较强的亚基因组间杂种优势。新型白菜型油菜的获得为白菜型油菜杂种优势利用提供遗传类型丰富而优良的亲本。

3.2 芥白杂交后代广泛分离

芥白杂种后代根据叶型、株高、花期等大致分为偏白菜型、中间型和偏芥菜型 3 种类型。以白菜型油菜为母本获得的 F₁ 为中间型,形态介于双亲之间,而以芥菜型油菜为母本合成的芥白杂种 F₁ 形态上偏芥菜型,这可能是由于杂种 F₁ 的遗传表达受胞质效应影响^[21-22]。在性状遗传方面,芥白杂交后代在 BC₁F₁、BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 均出现广泛分离,都以中间型为主,这与 D. Mohapatra 等^[23] 和 G. Olsson^[24] 的结果一致。芥白杂交后代中,群体变异广泛,有利于优良性状的筛选,如自交亲和、黄子等。芥白杂种 BC₁F₁ 自交不亲和,而 BC₁F₂ 和 BC₂F₁ 群体中出现自交亲和类型和高自交亲和类型。白菜型油菜自交不亲和是由于 A 基因组中 *SP11* 基因的表达,当 *SP11* 功能丢失,白菜型油菜表现自交亲和^[25],推测在芥白杂种后代中染色体的重组、代换导致母本 A 基因组上的自交不亲和相关基因丢失,从而出现自交亲和类型。

3.3 芥白杂交后代的细胞遗传学

芥白杂交 F₁ 植株花粉完全不育,自交不能结

实。然而, B. R. Choudhary 等^[12] 观察 *B. juncea* × *toria*, *B. juncea* × yellow sarson 杂交 F_1 花粉活力, 发现分别有 16.5% 和 20.4% 的花粉粒着色, 这可能与实验材料和生长环境的不同有关。杂种 F_1 植株部分花粉母细胞染色体数目加倍, 形成不减数配子, 也可能导致育性的部分恢复^[26]。本研究中, 杂种基因组构成为 AAB, 终变期花粉母细胞 (PMCs) 主要以 10 II + 8 I 配对方式, 这与 G. Olsson^[24] 研究结果一致, 染色体配对可见到单价体、二价体、三价体等形式, 以二价体为主, 二价体数目变化于 6 ~ 13 个, 除二价体外, 9.2% 的 PMCs 还出现多价体。这些多价体的出现表明, 在染色体上可能存在复制片段及 A 和 B 染色体具有部分同源性。 F_1 植株二价体数目最多的有 13 个, 说明 B 组染色体之间同样具有部分同源性, 而后期 I 分离比主要以 13/15 为主, 推测 B 组有 6 条染色体参与了部分同源配对。A 和 B 基因组, 以及 B 基因组之间的部分同源染色体的重组可能导致了芥白杂种后代产生的广泛变异, 具体的影响机制有待于进一步研究。R. Kapoor 等^[27] 首次合成了黑芥 - 白菜附加系, 改良了黑芥的品质。外源染色体附加系已经广泛用于基因作图、减数分裂的染色体行为等的研究^[28-29]。芥白杂交后代, 以中间型植株居多, 染色体数在 21 ~ 25 之间, 有利于优良白菜 - 黑芥附加系的选择。

本研究通过芥菜型油菜和白菜型油菜杂交首次合成了新型白菜型油菜, 而应用分子标记和基因组原位杂交检测 B 染色体及片段在各代植株的变化趋势, 检测新型白菜型油菜基因组中外源染色体及片段的渗入率及基因组变异程度, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 徐亮, 星晓蓉, 赵志, 等. 特早熟春油菜品种青杂 7 号的选育 [J]. 中国种业, 2011 (8): 66-68
- [2] 孙万仓, 范惠玲, 叶剑, 等. 白菜型油菜自交亲和性变异分析 [J]. 西北植物学报, 2006, 26 (4): 688-695
- [3] 刘淑艳, 刘忠松, 官春云. 芥菜型油菜种质资源研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (3): 351-358
- [4] 王建林, 何燕, 栾运芳, 等. 中国芸薹属植物的起源、演化与散布 [J]. 农业资源与环境科学, 2006, 22 (8): 489-494
- [5] Nagaharu U. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization [J]. Jpn J Bot, 1935, 7: 389-452
- [6] Qian W, Meng J, Li M, et al. Introgression of genomic components from Chinese *Brassica rapa* contributes to widening the genetic diversity in rapeseed (*B. napus* L.), with emphasis on the evolution of Chinese rapeseed [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113: 49-54
- [7] Leflon M, Grandont L, Huteau V, et al. Crossovers get a boost in *Brassica* allotriploid and allotetraploid hybrids [J]. Plant Cell, 2010, 22: 2253-2264
- [8] Mason A S, Nelson M N, Castello M C, et al. Genotypic effects on

the frequency of homoeologous and homologous recombination in *Brassica napus* × *B. carinata* Hybrids [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122: 543-553

- [9] Pires J C, Zhao J, Schranz M, et al. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (*Brassicaceae*) [J]. Biol J Linn Soc, 2004, 82: 675-688
- [10] Seyis F, Friedt W, Lühb W. Yield of *Brassica napus* L. hybrids developed using resynthesized rapeseed material sown at different locations [J]. Field Crop Res, 2006, 96: 176-180
- [11] Rahman M H. Resynthesis of *Brassica napus* L. for self-incompatibility; self-incompatibility reaction, inheritance and breeding potential [J]. Plant Breeding, 2005, 124: 13-19
- [12] Choudhary B R, Joshi P, Ramarao S. Cytogenetics of *Brassica juncea* × *B. rapa* hybrids and patterns of variation in the hybrid derivatives [J]. Plant Breeding, 2002, 121: 292-296
- [13] Cheng B F, Seguin-Swartz G, Somers D J, et al. Meiotic studies on mustard (*Brassica juncea*) germplasm possessing the fatty acid composition and white rust resistance of *B. napus* [J]. Cruciferae News, 1999, 21: 45-46
- [14] Cheng B F, Seguin-Swartz G, Somers D J, et al. Low glucosinolate *Brassica juncea* breeding line revealed to be nullisomic [J]. Genome, 2001, 44: 738-741
- [15] 范惠玲, 孙万仓, 武军艳, 等. 白芥自交亲和性分析 [J]. 西北植物学报, 2007, 27 (5): 859-863
- [16] 徐爱遇, 黄继英, 金平安, 等. 甘蓝型油菜和芥菜型油菜间杂交研究 [J]. 西北植物学报, 1999, 19 (3): 402-407
- [17] 周清元, 李加纳, 殷家明, 等. 白菜型油菜和羽衣甘蓝种间杂交的初步研究 I. 取材时间对子房离体培养结籽率的影响 [J]. 西北农业大学学报, 2003, 25 (6): 495-497
- [18] Leflon M, Eber F, Letanneur J C, et al. Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) × *Brassica napus* (AACC) hybrids [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113: 1467-1480
- [19] 邓婧, 李梅. 芸薹属植物远缘杂交不亲和性以及杂种后代遗传特性的研究进展 [J]. 作物研究, 2006 (5): 459-464
- [20] Meng J, Li M, Chen X, et al. Intersubgenomic heterosis in rapeseed production with a partial new-typed *Brassica napus* containing subgenome ar from *B. rapa* and Cc from *Brassica carinata* [J]. Crop Sci, 2006, 46 (1): 234-242
- [21] Tokumasu S. A hypodiploid of rape (*Brassica napus* L.) and chromosome variation in its progeny [J]. Jpn J Genet, 1984, 59: 527-535
- [22] Subudhi P K, Raut R N. White rust resistance and its association with parental species type and leaf waxiness in *Brassica juncea* L. Czern and Coss × *B. napus* L. crosses under the action of EDTA and gamma-rays [J]. Euphytica, 1993, 74: 1-7
- [23] Mohapatra D, Bajaj Y P S. Hybridization in *Brassica juncea* × *B. campestris* through ovary culture [J]. Euphytica, 1988, 37: 83-88
- [24] Olsson G. Species crosses within the genus *Brassica*. I. Artificial *Brassica juncea* Coss [J]. Hereditas, 1960, 46: 171-223
- [25] Udagawa H, Ishimaru Y, Nishio T, et al. Genetic analysis of interspecific incompatibility in *Brassica rapa* [J]. Theor Appl Genet, 2010, 121: 689-696
- [26] 程雨贵, 吴江生, 华玉伟, 等. 萝卜与甘蓝属间杂种基因组原位杂交分析 [J]. 遗传, 2006, 28 (7): 858-864
- [27] Kapoor R, Kaur G, Banga S, et al. Generation of *B. nigra*-*B. rapa* chromosome addition stocks: cytology and microsatellite markers (SSRs) based characterization [J]. New Biotechnol, 2011, 28: 407-417
- [28] Kynast R G, Okagaki R J, Galatowitsch M W, et al. Dissecting the maize genome by using chromosome addition and radiation hybrid lines [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 9921-9926
- [29] Cho S, Garvin D F, Muehlbauer G J. Transcriptome analysis and physical mapping of barley genes in wheat-barley chromosome addition lines [J]. Genetics, 2006, 172: 1277-1285