

甘蓝型油菜与白菜型油菜杂种后代细胞学和分子标记分析

殷 婷, 赵 彤, 柳海东, 李开祥, 余青兰, 赵志刚

(青海大学农林科学院 / 青海省春油菜遗传改良重点实验室 / 农业农村部春油菜科学观测实验站 /
青海省春油菜工程技术研究中心, 西宁 810016)

摘要: 本研究选用甘蓝型油菜和白菜型油菜进行种间杂交, 通过对杂交早期世代进行细胞学和分子标记研究, 期望为甘蓝杂交快速获得新型甘蓝型油菜提供支撑。结果表明: 甘蓝型油菜 ($2n=38$, AACC) 和白菜型油菜 ($2n=20$, AA) 杂交获得的 F_1 植株表型偏母本甘蓝型油菜, 染色体为预期的 29 条, 且花粉育性较差。套种获得的 F_2 植株形态学和细胞学分析发现偏白菜型油菜, 植株染色体数目为 20, 花粉母细胞 (PMCs) 染色体配对构型为 $1.64 \text{ I} + 9.11 \text{ II} + 0.04 \text{ III}$, 中间型植株染色体数目介于 24~28 之间, 偏甘蓝型油菜植株染色体数目介于 29~38 之间, 其中染色体数目为 38 的植株较少且自交结实困难, PMCs 中染色体配对构型为 $0.68 \text{ I} + 18.23 \text{ II} + 0.30 \text{ III}$ 。选择 F_2 偏甘蓝型油菜植株自交, 获得的 F_3 后代均为偏甘蓝型油菜, F_2 中染色体数为 35~36 的 F_2 植株产生的后代中约 40.00% 的植株 $2n=38$ 。由此可知, 对甘蓝杂交 F_2 后代进行表型 (偏甘蓝型油菜) 及细胞学 ($2n \geq 35$) 选择可获得甘蓝型油菜类型后代。染色体数目为 38 的 F_3 植株 PMCs 中染色体配对构型为 $0.59 \text{ I} + 18.30 \text{ II} + 0.26 \text{ III}$, 二价体数目变化于 16~19 之间, 以 19 II 为主, 占 58.62%, 单价体数目变化在 0~3 个之间, 且单价体和三价体数比 $2n=38$ 的 F_2 植株少。为研究甘蓝杂交后代亲本遗传物质的渗入, 利用 AFLP 和 SSR 分子标记技术对甘蓝杂交 F_2 、 F_3 进行检测。结果表明杂交后代 F_2 、 F_3 中特早熟白菜型油菜 A 基因组渗入的同时, 伴随了杂种后代 A 基因组和 C 基因组的双重变异。

关键词: 甘蓝型油菜; 白菜型油菜; 细胞学; 分子标记

Cytological and Molecular Analyses on Hybrids Progenies Derived from Crosses between *Brassica napus* L. and *Brassica rapa* L.

YIN Ting, ZHAO Tong, LIU Hai-dong, LI Kai-xiang, YU Qing-lan, ZHAO Zhi-gang

(Academy of Agricultural and Forestry Sciences of Qinghai University/ Key Laboratory of Spring Rapeseed Genetic Improvement of Qinghai Province / Spring Rape Scientific Observation Experimental Station of Ministry of Agriculture and Rural Areas/ Qinghai Province Spring Rape Engineering Technology Research Center, Xining, 810016)

Abstract: In this study, interspecific hybridization between *Brassica napus* L. ($2n=38$, AACC) and *Brassica rapa* L. ($2n=20$, AA) was performed, followed by cytological and molecular analyses of the progenies at the early generations in order to achieve rapidly acquisition of novel *B. napus* L.. The results showed that the F_1 plants obtained from the crosses between *B. napus* L. and *B. rapa* L. represented 29 chromosomes and low pollen fertility, with the phenotypic variation largely derived from the female parent *B. napus* L.. In F_2 plants, the morphological and cytological analyses revealed a proportion of plants with the *B. rapa*-like phenotype carrying

收稿日期: 2020-04-27 修回日期: 2020-05-13 网络出版日期: 2020-07-30

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20200427001>

第一作者研究方向为春油菜分子细胞遗传学, E-mail: 1294000573@qq.com

通信作者: 赵志刚, 研究方向为春油菜种质资源创新, E-mail: 13897474887@126.com

基金项目: 青海省春油菜遗传改良重点实验室 (2017-ZJ-Y09, 2020-ZJ-Y10); 国家重点研发计划 (2016YFD0100202); 青海省“高端创新人才千人计划”

Foundation projects: Key Laboratory of Spring Rape Genetic Improvement of Qinghai Province (2017-ZJ-Y09, 2020-ZJ-Y10), National Key Research and Development Program of China (2016YFD0100202), ‘High Level Innovation Talents Plan’ of Qinghai Province

20 chromosomes ($2n=20$, $1.64 \text{ I}+9.11 \text{ II}+0.04 \text{ III}$ in pollen mother cells (PMCs) at diakinesis), as was that of the parental line *B. rapa* L.. F_2 plants carrying 24-28 chromosomes was intermediate for phenotype, while the remaining plants with 29-38 chromosomes showed the phenotype similar to *B. napus* L.. A few plants containing 38 chromosomes presented low seed-set after self-pollination, and the chromosomes pairing configuration was $0.68 \text{ I}+18.23 \text{ II}+0.30 \text{ III}$. The *B. napus*-like F_3 plants were all derived from such F_2 plants, and the F_2 plants with $2n=35-36$ gave $\sim 40\%$ F_3 progenies with $2n=38$. It could be concluded that the production of the *B. napus*-like progeny was rational via the directional selection of the F_2 plants with such phenotype (*B. napus*-like) and cytology ($2n \geq 35$). During the PMCs meiosis of F_3 plants with 38 chromosomes, the pairing configuration was $0.59 \text{ I}+18.30 \text{ II}+0.26 \text{ III}$, and the number of bivalents ranged from 16-19, with mainly 19 II accounting for 58.62%, while the number of univalents was from 0 to 3. Compared with F_2 plants with 38 chromosomes, the number of univalents and trivalents decreased. In order to study the introgression of parental genetic material in the progenies, AFLP and SSR molecular markers were used for the F_2 and F_3 generations. The results showed that the A-genome of early maturing *B. rapa* L. was introgressed in the hybrid progenies of F_2 and F_3 , accompanied by the double variation of A-genome and C-genome of hybrid progenies.

Key words: *Brassica napus* L.; *Brassica rapa* L.; cytology; molecular markers

油菜作为重要的经济作物和油料作物,在我国常年播种面积 700 万 hm^2 以上,其中甘蓝型油菜占比高达 80%,白菜型油菜为 15%,芥菜型油菜仅为 5%^[1]。中国的甘蓝型油菜于 20 世纪 30 年代由欧洲引进,具有抗病、抗倒、抗裂角、产量高、品质好等突出特性^[2],在中华人民共和国成立后逐渐取代了之前的主栽种白菜型油菜和芥菜型油菜^[3]。缺乏野生种质资源,同时育种工作中的定向选择,使得甘蓝型油菜的遗传基础渐趋狭窄,遗传多样性匮乏^[4-7]。青藏高原被认为是春性白菜型油菜的起源地或次生起源地^[8-9],生长在高海拔地区的白菜型油菜资源是世界范围内生育期最短的油菜资源。甘蓝型油菜与白菜型油菜杂交较为容易且易获得甘蓝型品系^[10-13]。因此,充分利用白菜型油菜种质资源是丰富和拓宽甘蓝型油菜遗传变异和遗传基础的重要途径。

甘白杂交后代由于集合了双亲的基因组,形态特征具有双亲的某些特性,但后代的具体性状表现存在一定差异^[14-16]。杂种 F_1 花粉育性差,结实率较低,付绍红等^[17]发现可通过加倍改变染色体部分同源配对而造成的异常行为,从而提高自交结实性。赵志^[18]发现甘白杂交 F_2 偏白菜型油菜后代 F_3 中 $2n=20$ 的植株占 82.5%,且减数分裂过程中异常分裂较少,说明在杂交的 F_3 代就可开展位点纯合。Qian 等^[19]成功在((甘蓝型油菜/白菜型油菜)//白菜型油菜)BC₁ F_1 后代中选育出 1 株 $2n=38$ 且育性较高的甘蓝型植株。目前通过甘蓝型油菜和白菜型油菜杂交获得了不少优良的新型甘蓝型油菜^[20-24],但缺乏对甘白杂交早期世代的细胞遗传学

分析,而且在后代处理上,传统育种是采用与甘蓝型油菜多次回交,导致白菜型油菜只有少量的遗传物质导入甘蓝型油菜。本研究通过甘蓝型油菜与白菜型油菜种间杂交,利用形态学、细胞学、分子标记技术手段对 F_1 及自交或姊妹交 F_2 、 F_3 进行分析,揭示甘白杂种后代染色体数目变化趋势以及特早熟白菜型油菜遗传物质在杂交后代遗传渗入的过程和状态,从而为通过甘白杂交快速获得新型甘蓝型油菜提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

选用的甘蓝型油菜品种为半冬性品系 2144,白菜型油菜品种为特早熟的浩油 11 号,都是高自交后代且遗传稳定的材料,由青海大学农林科学院春油菜研究所提供。甘蓝型油菜和白菜型油菜于 2017 年 9 月 5 日和 15 日分批播种于青海大学农林科学院春油菜研究所温室内,常规田间管理。

1.2 方法

1.2.1 杂交方法 选择生长健壮且无明显病虫害的亲本植株,对 2144 进行隔离去雄,授以浩油 11 号的花粉,套袋获得 F_1 种子。杂交种 F_1 自交结实困难,经过套纱帐获得 F_2 ,选择偏甘蓝型油菜材料自交获得 F_3 。

1.2.2 花粉育性观察 晴天选取新开放的花朵,取长、短雄蕊各一枚,将花粉适量涂抹在载玻片上,滴 1 滴 1% 的醋酸洋红溶液进行染色制片,置于显微镜 10 倍镜下,每朵花选取 3 个视野进行观察,统计

各视野下可育、不可育花粉粒数目。视野中大、圆且被染为红色的为可育花粉,小、瘪且未被染色呈橘色的为不可育花粉。统计可染花粉粒所占比例即为花粉可染率,以其表示花粉育性。观察不同花朵时需 75% 酒精擦拭手和实验用具。

1.2.3 有丝分裂观察 田间选取幼嫩花蕾剥离的子房在常温下用 8- 羟基喹啉溶液黑暗处理 3~4 h 后,用卡诺固定液浸泡固定,于 4 °C 环境保存。将固定好的子房放入 1 mol/L 盐酸溶液中,置 60 °C 的恒温水浴锅内解离 8 min,解离后用蒸馏水冲洗多余的盐酸溶液,在载玻片上用镊子捣碎后,用改良的卡宝品红染色压片,显微镜下观察并记录染色体数目。

1.2.4 减数分裂观察 田间选取幼嫩花蕾置于卡诺固定液中,更换溶液至花蕾褪色,4 °C 保存。挑取固定后幼嫩花蕾中的花药,在 1 mol/L 盐酸溶液中 60 °C 恒温水解离 3 min,蒸馏水清洗后,用改良的卡宝品红染色压片,显微镜下观察并记录花粉母细胞减数分裂时的染色体行为。

1.2.5 基因组 DNA 提取 在田间鉴定及统计分析的基础上,于苗期取各材料的新生叶片 2 g 左右置于 2 mL 离心管中,并放入冰盒中带回实验室冰冻保存,利用 CTAB 法^[25]提取 DNA。提取完成后的 DNA 用紫外分光光度计测定浓度,使用前用蒸馏水把 DNA 原液稀释至 50 ng/ μ L 待用。

1.2.6 AFLP 分子标记 试验所用的限制性内切酶、接头、连接酶、引物、10 \times Buffer、dNTPs 及 Taq E 均购于上海生物工程服务有限公司,AFLP 分析主要参照 Vos 等^[26]的实验方法进行。

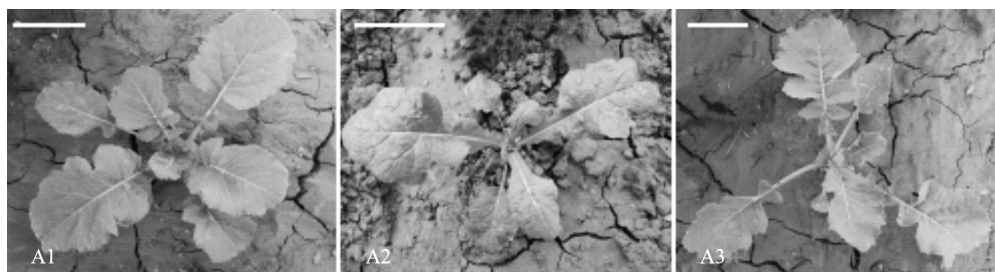
1.2.7 SSR 分子标记 参考 <http://ukcrop.net> 的 Brassica 数据库,设计 SSR 引物,由上海生物工程服务有限公司合成,分析按照 Tautz^[27]描述的方法进行,采用 10 μ L 扩增体系。扩增体系完成后,反应程序为: 94 °C 2 min, (94 °C 1 min, 60 °C 30 s (每个循环降 0.5 °C), 72 °C 45 s) \times 10 cycles, (94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s) \times 29 cycles, 72 °C 5 min, 扩增结束后 4 °C 保存备用。

1.2.8 条带统计和分析 电泳条带进行量化,有带记为 1,无带记为 0,缺样记为 2。

2 结果与分析

2.1 甘白杂种及后代植株的形态学分析

甘白杂交后代植株形态上存在明显的差异。 F_1 植株通过形态、花粉育性及体细胞观察,发现形态整体偏甘蓝型油菜(图 1),花粉育性低于 50.00%,染色体数目为 29 且自交结实困难。为后期选择偏甘蓝型油菜植株,鉴定为真杂种的 F_1 套纱帐获得 F_2 群体。 F_2 群体植株根据叶型、株高等可进行表型划分。由表 1 可知: F_2 群体共调查 122 株,偏甘蓝型油菜占群体的 69.67%,偏白菜型油菜、中间型和其他分别占 4.10%、21.31% 和 4.92%。 F_2 群体以偏甘蓝型油菜植株为主,其次为中间型,偏白菜型油菜最少,其他类型的植株有少量出现。挑选偏甘蓝型油菜的 F_2 植株自交或人工辅助授粉获得 F_3 群体,后代植株均表现为偏甘蓝型油菜,未出现其他类型的材料。结果表明:甘白杂交后代以偏甘蓝型油菜植株为主,说明以甘蓝型为母本、白菜型为父本更易获得甘蓝型油菜类型后代。



A1: 2144; A2: 浩油 11 号; A3: F_1 (2144 \times 浩油 11 号) (1 bar=5 cm)

A1: 2144, A2: Haoyou 11, A3: F_1 (2144 \times Haoyou 11) (1 bar=5 cm)

图 1 甘白杂交亲本及 F_1 形态观察

Fig.1 Morphological observation of the parents and F_1 between *B. napus* L. and *B. rapa* L.

2.2 F_2 群体细胞学分析

F_2 群体 100 个单株进行体细胞观察,其染色体数目介于 20~38 之间,如表 2 所示。 $2n=20$ 的植株形态上偏白菜型油菜,PMCs 内染色体配对构型为

1.64 I+9.11 II+0.04 III,中期 I 出现落后染色体,后期 I/II 出现落后染色体和染色体桥(图 2A),后期 I 主要以 10/10 分离,占观察细胞的 53.85%,四分体时期观察到三分孢子。 $2n=24\sim 28$ 的植株形态介于双

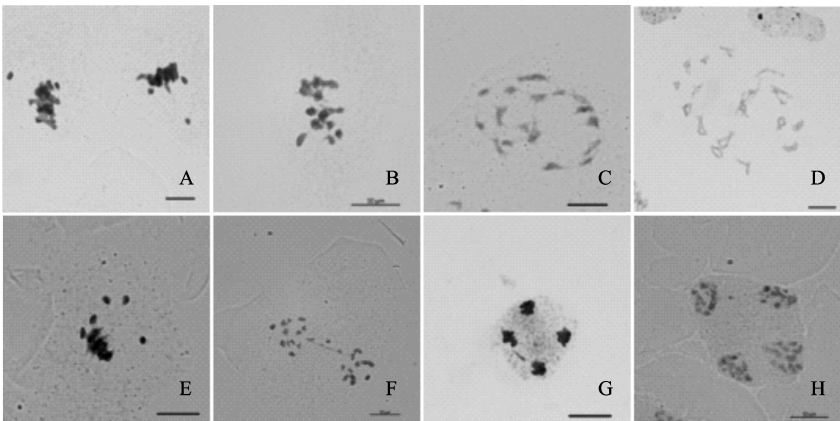
表 1 甘白杂种 F₂ 后代的表型变异
Table 1 Morphological variation of F₂ progenies from hybrids between *B. napus* L. and *B. rapa* L.

植株类型 Plant type	植株数目 No. of plants	比例 (%) Percentage
偏白菜型 <i>B. rapa</i> -like	5	4.10
中间型 Intermediate	26	21.31
偏甘蓝型 <i>B. napus</i> -like	85	69.67
其他 Others	6	4.92
总计 Total	122	100.00

亲之间,二价体数目为 6~14 个(图 2B),有落后染色体,后期 I/II 分离时均出现落后染色体和染色体桥,四分体时期个别出现多分孢子。2n=29~38 的植株形态偏甘蓝型油菜,29~37 之间的植株二价体数目介于 10~18 之间(图 2C、D),后期 I/II 分离时出现落后染色体和染色体桥(图 2E、F、G),四分体时期出现三分孢子;染色体 38 条的植株二价体数目在 16~19 之间,染色体配对构型为 0.68 I+18.23 II+0.30 III,四分体时期以四分孢子为主(图 2H)。

表 2 F₂ 植株 PMCs 内的染色体配对构型
Table 2 Chromosome pairing associations in PMCs of the F₂ plants

染色体数目 No. of chromosomes	PMCs 数目 No. of PMCs	终变期平均染色体构型(变化范围) Chromosome associations at diakinesis (Range of variation)		
		I	II	III
20	76	1.64 (0~4)	9.11 (8~9)	0.04 (0~1)
24	100	4.55 (0~10)	9.01 (6~12)	0.45 (0~2)
26	100	2.97 (0~8)	10.98 (8~13)	0.37 (0~2)
27	100	1.28 (0~5)	12.11 (10~13)	0.50 (0~3)
28	102	2.32 (0~8)	12.03 (8~14)	0.54 (0~2)
29	50	3.90 (1~11)	12.04 (10~14)	0.10 (0~1)
30	134	2.24 (0~10)	13.19 (10~15)	0.56 (0~2)
31	99	1.35 (0~6)	14.01 (11~15)	0.54 (0~1)
32	100	1.45 (0~4)	14.67 (12~16)	0.39 (0~2)
33	100	3.36 (0~9)	13.84 (10~16)	0.61 (0~3)
34	58	1.46 (0~8)	15.91 (12~17)	0.16 (0~2)
35	47	2.13 (0~11)	16.15 (12~17)	0.19 (0~2)
36	70	1.19 (0~6)	16.93 (15~18)	0.33 (0~2)
37	48	1.94 (0~5)	17.13 (15~18)	0.27 (0~2)
38	37	0.68 (0~4)	18.23 (16~19)	0.30 (0~2)



A: 染色体 20 条 PMCs 中期 I; B: 染色体 26 条 PMC 终变期 13 II; C: 染色体 31 条 PMC 终变期 15 II +1 I; D: 染色体 33 条 PMC 终变期 16 II +1 I; E: 染色体 28 条 PMC 中期 I; F: 染色体 26 条 PMC 后期 I 落后染色体和染色体桥; G: 染色体 33 条 PMC 后期 II 染色体桥; H: 染色体 38 条 PMC 四分孢子 (1 bar=10μm)
A: Some metaphase I PMCs with 2n=20, B: A diakinesis PMC with 13 II in 2n=26, C: A diakinesis PMC with 15 II +1 I in 2n=31, D: A diakinesis PMC with 16 II +1 I in 2n=33, E: A metaphase I PMC with 2n=28, F: An anaphase I PMC with some chromosomes lagging and chromosome bridge 2n=26, G: An anaphase II PMC with chromosome bridge in 2n=33, H: A tetraspore PMC (1 bar=10 μm)

图 2 F₂ 植株 PMCs 减数分裂观察
Fig.2 The meiosis observation in PMCs of F₂ plants

2.3 F₃ 世代的细胞学分析

在 F₂ 群体中选取偏甘蓝型油菜植株, 将自交种子于 2019 年 5 月播种于试验田。根据叶型、株高等调查发现 F₃ 群体形态上均偏甘蓝型油菜, 鉴定出具有 38 条染色体的植株 21 株, 占细胞学观察植株总数的 21.65%。各个不同染色体数的 F₂ 植株产生了不同比例的 2n=38 的 F₃ 后代(表 3): 染色体数目为 29~30 的比例为 8.33%~16.67%, 染色体数目为 31~34 的为 17.86%~25.00%, 染色体数目为 35~36 的为 40.00%。

对 2n=38 的 F₃ 植株进行减数分裂观察。终变期 87 个花粉母细胞中染色体配对并非全为 19 个二价体, 也有不同数量的单价体、多价体, 但二价体居多(表 4), 平均染色体配对构型为 0.59 I + 18.30 II + 0.26 III。二价体染色体数目变化介于 16~19 之间, 以 19 II 的细胞频率最高, 为 58.62%(表 4、5); 单价体和三价体在花粉母细胞中少量存在, 出现频率为 34.49% 和 20.69%, 变化数目在 0~3、0~2 之间(表 4)。中期 I 观察的 103 个 PMCs 中, 不同数目的单价体围绕着赤道板分布在不同的位置, 45.63% 的 PMCs 无单价体存在。后期 I / II 的 76 个 PMCs 基本是二价体正常分离, 单价体随机分配, 两极染色体数目大致相等, 也有单价体落后现象, 占 2.63%, 主要以 19/19 方式分离, 占总细胞的 55.26%, 其余以 20/18、21/17 等方式分离。处于四分体时期的 96 个 PMCs 中, 5.21% 出现三分、五分孢子, 4.17% 出现微核。

表 3 甘蓝型油菜类型 F₂ 植株产生的具有 2n=38 的 F₃ 植株比例

Table 3 The rates of the F₃ plants with 2n=38 produced by the *B. napus*-like F₂ plants with different chromosomes

F ₂ 染色体数目 No. of chromosomes in F ₂	2n=38 的 F ₃ 植株 No. of plants with 2n=38 in F ₃	2n=38 的 F ₃ 植株比例 (%) The percentage of the plants with 2n=38 in F ₃
29	1	8.33
30	2	16.67
31	3	23.08
32	5	17.86
33	3	20.00
34	1	25.00
35	4	40.00
36	2	40.00

表 4 2n=38 的 F₃ 植株 PMCs 染色体配对

Table 4 Chromosomes pairing in PMCs of F₃ plants with 2n=38

配对类型 Pairing	PMCs 数目 No. of PMCs	比例 (%) Percentage	变化范围 Range of No.	平均数 Average
单价体 Univalent	30	34.49	0~3	0.59
二价体 Bivalent	87	100.00	16~19	18.30
三价体 Trivalent	18	20.69	0~2	0.26

表 5 2n=38 的 F₃ 植株 PMCs 内二价体数目及频率

Table 5 Bivalent numbers and percentages in PMCs of F₃ plants with 2n=38

项目 Item	16 II	17 II	18 II	19 II	合计 Total
花粉母细胞数 No. of PMCs	7	11	18	51	87
百分率 (%) Percentage	8.05	12.64	20.69	58.62	100.00

2.4 亲本遗传物质在后代的遗传渗入

2.4.1 甘白杂交后代 AFLP 及 SSR 多态性 选取 28 对 AFLP 引物对全部材料进行扩增(表 6), 结果表明在 F₂ 和 F₃ 植株中均扩增出 788 条带, 其中显示多态性的条带分别有 608 条和 543 条, 分别占其总条带的 77.16% 和 68.91%, 各世代平均每对引物检测等位基因位点分别为 21.71 个和 19.39 个, 由于本实验采用的是银染技术, 为确保实验的准确性, 仅选取了染色较为清晰的多态性条带, 片段大小介于 30~700 bp 之间。28 对 AFLP 引物扩增结果中, F₂、F₃ 植株除母本带型外, 均扩增出了 3 种特异性条带: 父本特早熟白菜型油菜浩油 11 号特征带、母本甘蓝型油菜 2144 缺失带和相对双亲的新增带。

选取双亲材料各两份用于 SSR 引物筛选, 从 200 对 A 基因组特异 SSR 引物中筛选出 72 对多态性引物。对供试材料进行分析, 扩增结果显示 F₁ 同时具有双亲条带, 且无其他带型, 由此进一步证明 4 个植株为真杂种。F₂ 和 F₃ 中分别扩增出 273 条带和 275 条带, 其中显示多态性的条带分别有 270 条带和 255 条带, 分别占其总条带的 98.90% 和 92.73%, 各世代平均每对引物检测等位基因位点分别为 3.75 个和 3.54 个, 片段大小介于 90~550 bp 之间。

表 6 甘白杂交后代的 AFLP 和 SSR 标记分析
Table 6 AFLP and SSR amplifications of the progenies from the hybrids

标记方式 Marker	杂交后代 Hybrid progenies	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比率(%) Polymorphism rate	平均每对引物检测等位基因数 Average No. of alleles per pair of primers
基因组 AFLP AFLP of genome	F ₂	788	608	77.16	21.71
	F ₃	788	543	68.91	19.39
A 基因组 SSR SSR of A-genome	F ₂	273	270	98.90	3.75
	F ₃	275	255	92.73	3.54
C 基因组 SSR SSR of C-genome	F ₂	166	165	99.40	3.67
	F ₃	162	161	99.38	3.58

用双亲材料筛选出 C 基因组特异 SSR 引物 45 对。对供试材料进行分析表明,在 F₂ 和 F₃ 中分别扩增出 166 条带和 162 条带,其中显示多态性的条带分别有 165 条带和 161 条带,分别占其总条带的 99.40% 和 99.38%,各世代平均每对引物检测等位基因位点分别为 3.67 个和 3.58 个,片段大小介于 100~510 bp 之间。

2.4.2 白菜型油菜 A 基因组的渗入与变异 由于亲本甘蓝型油菜和白菜型油菜都包含 A 基因组,为便于区分 A 基因组的来源,白菜型油菜的 A 基因组用 A^r 表示,甘蓝型油菜 A 基因组用 Aⁿ 表示。本研究用 72 对 A1~A10 染色体的特异性 SSR 引物对甘白杂交后代材料进行扩增,如表 7 所示:浩油 11 号的 A 组染色体 A1~A10 遗传物质在甘白

杂交后代均有不同程度的渗入,F₂ 和 F₃ 渗入率在 14.79%~29.00%、10.53%~26.98% 之间,分别在 A7、A4 染色体渗入率最高,A5、A10 染色体渗入率最低。杂交后代在 A1~A10 不同染色体的变异情况不同(图 3),F₂、F₃ 均在 A5 染色体上变异率最高,A6 染色体上最低。

2.4.3 甘蓝型油菜 C 基因组变异分析 对 F₂、F₃ 用 45 对 C1~C9 染色体的特异性 SSR 引物进行变异分析,结果如表 8 所示。F₂、F₃ 在 C1~C9 各染色体的变异情况不同。F₂ 在 C1~C9 染色体扩增出的总条带在 612~1573 条之间,缺失带为 0~210 条,新增带在 0~213 条之间,且 C8 染色体上未检测到变异位点,C1 染色体上缺失率、新增率均最大,依次为 20.11% 和 20.40%,变异程度最高。F₃ 在 C1~C9 染

表 7 杂交后代中白菜型油菜 A^r 染色体遗传渗入
Table 7 The genetic introgression of A^r chromosomes from *B. rapa* L. into the hybrid progenies

染色体 Chromosome	引物 对数 No. of primers	F ₁			F ₂			F ₃		
		总带数 Total bands	A ^r 特征带数 No. of A ^r characteristic bands	渗入率 (%) Introgression rate	总带数 Total bands	A ^r 特征带数 No. of A ^r characteristic bands	渗入率 (%) Introgression rate	总带数 Total bands	A ^r 特征带数 No. of A ^r characteristic bands	渗入率(%) Introgression rate
A1	11	253	79	31.23	2091	570	27.26	1654	413	24.97
A2	7	135	36	26.67	1031	217	21.05	953	203	21.30
A3	7	154	60	38.96	1273	345	27.10	1031	237	22.99
A4	6	97	36	37.11	1064	301	28.29	908	245	26.98
A5	6	114	46	40.35	1095	162	14.79	1056	128	12.12
A6	9	182	59	32.42	1341	386	28.78	1155	251	21.73
A7	8	192	90	46.88	1176	341	29.00	970	182	18.76
A8	5	130	40	30.77	1071	231	21.57	914	219	23.96
A9	6	181	60	33.15	1250	247	19.76	1106	217	19.62
A10	7	233	69	29.61	1598	268	16.77	1216	128	10.53

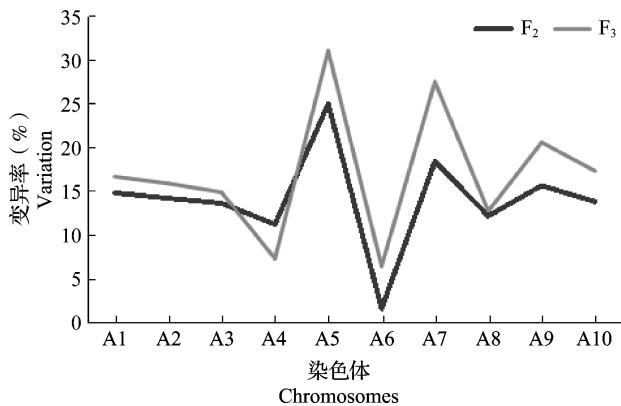


图3 杂交后代 A 基因组各染色体变异率
Fig.3 The variation rate on different A-genome chromosomes of hybridization progenies

色体扩增出的总条带在 487~1347 条之间,缺失带为 0~200 条,新增带为 0~172 条,且与 F₂ 相同,均未在 C8 染色体上检测到变异位点,C2 染色体上变异最大,为 27.49%。对 F₂、F₃ 进行 C 基因组染色体变异分析可知:杂交后代 F₂、F₃ 分别在 C1、C2 染色体变异最高,均在 C8 染色体上未发生变异。

3 讨论

目前,甘白杂交创制新型甘蓝型油菜的研究较多,但缺乏对其早期世代细胞遗传学分析,且后代选育时多为传统的与甘蓝型油菜多次回交,这样创制的新型甘蓝型油菜中白菜型油菜遗传成分较少。本研究主要对甘白杂交早期世代 F₁ 及自交或姊妹交

表 8 杂种后代中甘蓝型油菜 C 基因组的遗传变异
Table 8 The genetic variations of C-genome in hybrid progenies

染色体 Chromosome	引物对数 No. of primers	F ₂						F ₃					
		总带数 Total bands	缺失带数 Missing bands	缺失率 (%) Missing rate	新增带数 Novel bands	新增率 (%) Novel rate	变异率 (%) Variation rate	总带数 Total bands	缺失带数 Missing bands	缺失率 (%) Missing rate	新增带数 Novel bands	新增率 (%) Novel rate	变异率 (%) Variation rate
C1	5	1044	210	20.11	213	20.40	40.52	785	64	8.15	33	4.20	12.36
C2	7	1345	96	7.14	156	11.60	18.74	1215	163	13.42	171	14.07	27.49
C3	3	647	20	3.09	38	5.87	8.96	531	67	12.62	27	5.08	17.70
C4	4	802	1	0.12	42	5.24	5.36	608	0	0	3	0.49	0.49
C5	6	1573	199	12.65	78	4.96	17.61	1347	200	14.85	54	4.01	18.86
C6	5	612	106	17.32	0	0	17.32	487	95	19.51	0	0	19.51
C7	7	1244	70	5.63	158	12.70	18.33	1076	118	10.97	172	15.99	26.95
C8	3	622	0	0	0	0	0	506	0	0	0	0	0
C9	5	728	40	5.49	87	11.95	17.45	630	28	4.44	52	8.25	12.70

F₂、F₃ 进行细胞学、分子标记分析,揭示甘白杂种后代染色体数目变化趋势、白菜型油菜遗传物质在杂交后代遗传渗入的过程及后代 A 和 C 基因组的变异,从而为通过甘白杂交快速获得新型甘蓝型油菜提供技术支撑。

3.1 甘白杂交后代广泛分离

远缘杂交后代集合了双亲基因组,性状通常会发生广泛分离,表现出介于双亲之间的性状,也会表现某些超亲性状,甚至表现一些双亲均不曾出现的新性状。远缘杂种由于存在异源染色体,在减数分裂时基因组染色体会出现不规则的联会配对行为,会发生同源染色体重组和异源染色体重组以及非整

倍体的出现,造成后代性状的变异。远缘杂交后代产生变异的性状较多,如形态特征和生理生化特性等。本研究以甘蓝型油菜为母本,特早熟白菜型油菜为父本获得的 F₁ 植株大多生长旺盛,分枝较多,其花期和株高介于双亲之间,但整体形态偏母本甘蓝型油菜,通过甘蓝型油菜与特早熟白菜型油菜杂交后代性状与其他芸薹属植物远缘杂交后代相比,发现一些相同之处。如何凤仙等^[28]通过甘蓝型油菜与荠菜属间杂交后代外部形态偏向母本,部分有利性状如成熟期早、分枝部低、茎秆较矮等偏向父本,且进行解剖观察发现具有双亲结构特征,少数有超亲性状。在孙龙涛^[29]的研究中发现,黑芥与白

菜杂种性状整体介于双亲之间,但个别性状偏向于母本。乔海云^[30]通过大白菜与诸葛菜杂交,对杂种 F_1 观察发现形态特征总体偏母本大白菜,某些植株表现父本诸葛菜的分枝基部、茎秆为紫红色特性。远缘杂交种中出现一些异常现象如父本染色体的消除、染色体渗入及不减数配子的结合等会产生偏母本或其他类型的植株。如牛妍^[31]在进行芥菜型与白菜种间杂交时发现,芥菜型油菜 \times 白菜型油菜的 F_1 表型偏芥菜型、生长旺盛、分枝少、花粉完全不育,而白菜型油菜 \times 芥菜型油菜的植株形态介于中间型,分枝基部丛生且较多。

甘白杂种 F_1 花粉育性不佳,自交结实性低,通过常规的套袋自交难以得到足够多的自交种,无法满足下一代选择。本研究对 F_1 套纱帐,通过人工辅助传粉,在一定程度上解决了这一难题。杂种 F_1 进行减数分裂时由于多种配对与分离方式引起配子中不同的染色体组成,导致 F_2 植株在染色体数量和组成上的差异,在形态上发生广泛变异。根据形态特征变化情况,本研究的甘白杂交后代植株主要分为偏甘蓝型油菜、中间型、偏白菜型油菜,且依次减少,同时存在个别其他类型的变异植株,与王学芳等^[22]利用白菜类蔬菜与甘蓝型油菜杂交创制早熟甘蓝型油菜过程中 F_2 表型观察基本一致。 F_3 为 F_2 中偏甘蓝型油菜自交后代,表型均为偏甘蓝型油菜。甘白杂交后代 F_1 、 F_2 、 F_3 中均以偏甘蓝型油菜植株最多,说明甘白种间杂交更易获得甘蓝型油菜,这与周永明等^[13]的研究结果一致。同时,杂交后代中群体的广泛变异有利于多种优良性状的筛选。

3.2 甘白杂交后代的细胞学

由于甘白杂种染色体数目为双亲配子染色体数之和,说明每一个亲本只提供了相当于单倍体的基因组,双亲基因组间具有较大的差异,导致基因组内同源配对及基因组间部分同源配对,减数分裂终变期形成多价体,同源性较低的染色体形成单价体,从而出现落后染色体、染色体桥等异常现象,形成多种类型的配子。通过体细胞观察发现后代 F_2 染色体数目存在明显差异,表型偏白菜型油菜植株 $2n=20$,中间型植株 $2n=24\sim 28$,偏甘蓝型油菜植株 $2n=29\sim 38$,这与牛妍^[31]的芥白杂交研究结果相似。因芥白杂交后代染色体数目为 20 的偏白菜型油菜,染色体数目 21~25 之间为中间型,染色体数目 26~28 之间偏芥菜型,染色体数目越多,形态越偏向染色体数目多的亲本。偏白菜型油菜和中间型植株染色体在 20~28 之间,在选育新型甘蓝型油菜

时,可以初步给予淘汰。 F_2 中染色体为 38 条的植株很少,且自交难以结实。 F_2 群体偏甘蓝型油菜植株自交后代 F_3 全为偏甘蓝型油菜,细胞学观察发现 F_2 中 $2n=35\sim 36$ 的植株自交后代 $2n=38$ 的植株达 40.00%,且减数分裂单价体、三价体明显减少。

3.3 甘白杂交后代的遗传渗入与变异

前人甘蓝型油菜进行全基因组分析表明,A 亚基因组重组多于 C 亚基因组,且热点区连锁不平衡的热点分布多,基因丰富。同时,对甘蓝型油菜部分性状进行基因定位研究,结果表明甘蓝型油菜的许多性状控制基因来源于 A 染色体^[32-34],故 A 基因组对甘蓝型油菜的遗传变异具有极大的潜力^[10-11]。本研究以甘蓝型油菜为母本,特早熟白菜型油菜为父本,成功获得了杂种植株 F_1 ,经花粉育性、染色体数目及分子标记鉴定为真杂种。采用 AFLP 和 SSR 分子标记分析了甘白杂交早期世代 F_2 和 F_3 的遗传成分,发现杂交后代均检测到特早熟白菜型油菜的特征带,且各材料之间的渗入程度存在一定的差异,这可能与杂交后代染色体数目及组成有关。特早熟白菜型油菜 A 基因组遗传物质在 F_2 、 F_3 的 A1~A10 染色体上渗入存在差异。随着世代的增加,特早熟白菜型油菜的渗入率趋于下降,与钱伟^[35]采用 AFLP、SSR 分子标记对甘白杂交合成的新型甘蓝型油菜早期世代和高世代遗传成分检测结果相一致。

A 基因组特异性 SSR 引物对 F_2 和 F_3 进行分析,杂交后代除了父母本特征带外,还出现了亲本缺失带及相对双亲的新增带,这可能是特早熟白菜型油菜特异序列的渗入,使后代染色体重组和基因改变。A 基因组 A1~A10 染色体发生了变异,均在 A5 最高,A6 最低。C 基因组特异性 SSR 引物对 F_2 和 F_3 进行分析,杂交后代也出现了亲本缺失带及相对双亲的新增带,说明杂交后代在白菜型油菜 A 基因组渗入及 A 基因组 A1~A10 染色体变异的同时,甘蓝型油菜 C 基因组除 C8 外,C1~C10 染色体上不同程度的变异。外源染色体的渗入导致受体基因组结构及基因表达发生改变,导致甘白杂交后代中特早熟白菜型油菜 A 基因组渗入的同时,伴随了特早熟白菜型油菜 A 基因组和甘蓝型油菜 C 基因组的变异。甘白杂交后代在形态和基因组 DNA 分子水平都显示出丰富的变异,说明通过甘蓝型油菜与特早熟白菜型油菜种间杂交拓宽甘蓝型油菜遗传背景具有良好的前景。种间杂交产生丰富变异的原因可能是杂种后代不仅含有甘蓝型油菜的 A、C 基

因组,还包含了特早熟白菜型油菜的 A 基因组,虽然甘蓝型油菜和白菜型油菜都具有 A 基因组,但在遗传进化过程中,二者的 A 基因组之间发生了极大的分化,且 A 基因组与 C 基因组染色体间同源性较高,各基因组间可发生较高频率的同源或部分同源重组。因此,充分利用白菜型油菜遗传物质,对改良原有甘蓝型油菜的遗传特性具有重要的意义。

参考文献

- [1] 江莹芬. 埃塞俄比亚芥的遗传多样性研究及芸薹属异源六倍体的创造. 武汉: 华中农业大学, 2005
Jiang Y F. Studies on genetic diversity of *Brassica carinata* and production of Brassica of hexaploid. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2005
- [2] 何丽. 白菜型冬油菜与甘蓝型冬油菜远缘杂交研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2013
He L. Studies on wide crosses between winter *Brassica rapa* and *Brassica napus* L.. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013
- [3] 王爱凡, 康雷, 李鹏飞, 李再云. 我国甘蓝型油菜远缘杂交和种质创新研究进展. 中国油料作物学报, 2016, 38(5): 691-698
Wang A F, Kang L, Li P F, Li Z Y. Review on new germplasm development in *Brassica napus* through wide hybridizations in China. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2016, 38(5): 691-698
- [4] Becker H, Engqvist G, Karlsson B. Comparison of rapeseed cultivars and resynthesized lines based on allozyme and RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91: 62-67
- [5] 张锦芳, 郑本川, 李浩杰, 蒲晓斌, 崔成, 柴颀, 蒋俊, 蒋梁材. 甘白远缘杂交新材料的创建及后代株系鉴定. 西南农业学报, 2015, 28(6): 2389-2394
Zhang J F, Zhen B C, Li H J, Pu X B, Cui C, Chai L, Jiang J, Jiang L C. Creation and identification of germplasm from interspecific hybrid between *Brassica napus* and *Brassica japonica* sieb. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(6): 2389-2394
- [6] Seyis F, Snowdon R J, Luhs W, Friedt W. Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of thrie genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars. Plant Breeding, 2003, 122: 473-478
- [7] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 刘贵华, 张书芬. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础. 中国农业科学, 2006, 47(2): 246-256
Wen Y C, Wang H Z, Shen J X, Liu G H, Zhang S F. Analysis of genetic diversity and genetic basis of Chinese rapeseed cultivars (*Brassica napus* L.) by Sequence-Related Amplified Polymorphism markers. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 47(2): 246-256
- [8] 王建林, 栾运芳, 大次卓嘎, 张永青, 常天军, 方华丽, 成海宏, 何燕. 中国栽培油菜的起源和进化. 作物研究, 2006, 20(3): 199-205
Wang J L, Luan Y F, Daci Z G, Zhang Y Q, Chang T J, Fang H L, Cheng H H, He Y. Origin and evolution of cultivable rapeseeds in China. Crop Research, 2006, 20(3): 199-205
- [9] 何余堂, 陈宝元, 傅廷栋, 李殿荣, 涂金星. 白菜型油菜在中国的起源与进化. 遗传学报, 2003, 30(11): 1003-1012
He Y T, Chen B Y, Fu T D, Li D R, Tu J X. Origins and evolution of *Brassica campestris* L. in China. Acta Genetica Sinica, 2003, 30(11): 1003-1012
- [10] 魏大勇. 甘蓝型油菜遗传结构分析和选择驯化研究. 重庆: 西南大学, 2015
Wei D Y. Analysis of genetic structure and selection and domestication of *Brassica napus*. Chongqing: Southwest University, 2015
- [11] Qian L, Wei Q, Snowdon R J. Sub-genomic selection patterns as a single of breeding in the allopolyploid *Brassica napus* genome. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1-17
- [12] Myers J R. Outcrossing potential for *Brassica* species and implications for vegetable crucifer seed crops of growing oilseed *Brassica* in the Willamette Valley. Oregon State: Oregon State University, 2006
- [13] 周永明, Searth R. 甘蓝型油菜与白菜型油菜种间杂种的小孢子培养. 植物学报, 1995, 44(11): 848-855
Zhou Y M, Searth R. Microspore culture of hybrids between *Brassica napus* and *B. campestris*. Chinese Bulletin of Botany, 1995, 44(11): 848-855
- [14] Tu Y K, Chen H W, Tseng K Y, Lin Y C, Kuo B J. Morphological and genetic characteristics of F_1 hybrids introgressed from *Brassica napus* to *B. rapa* in Taiwan. Botanical Studies, 2020, 61: 1-13
- [15] 伍晓明, 许鲲, 王汉中, 郑普英, 陈碧云, 李响枝. 甘蓝型油菜与新疆野生油菜属间杂种的获得与分子鉴定. 中国油料作物学报, 2003, 24(4): 5-9
Wu X M, Xu K, Wang H Z, Zheng P Y, Chen B Y, Li X Z. Production and molecular identification of intergeneric hybrids between *B. napus* and Chinese Xinjiang wild rape (*Sinapis arvensis*). Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 24(4): 5-9
- [16] 王丽萍, 杨刚, 孙万仓, 张正丽, 王月, 董红业, 赵艳宁, 孔德晶, 鲁美宏, 杨宁宁, 刘自刚, 方彦, 武军艳. 白菜型冬油菜和春油菜杂交后代抗寒性与植物学特性. 干旱地区农业研究, 2015, 33(4): 291-296
Wang L P, Yang G, Sun W C, Zhang Z L, Wang Y, Dong H Y, Zhao Y N, Kong D J, Lu M H, Yang N N, Liu Z G, Fang Y, Wu J Y. Cold resistance and botanical characteristics of the hybrid prgeny between winter and spring turnip rapes (*Brassica campestris* L.). Agricultural Research in the Arid Areas, 2015, 33(4): 291-296
- [17] 付绍红, 李云, 杨进, 王继胜, 陈晓华, 邹琼, 陶兰蓉, 康泽明, 唐蓉, 张汝全. 染色体加倍获得甘白(甘蓝型 × 白菜型油菜)杂交后代研究. 西南农业学报, 2012, 25(4): 1164-1170
Fu S H, Li Y, Yang Y, Wang J S, Chen X H, Zou Q, Tao L R, Kang Z M, Tang R, Zhang R Q. Study on obtaining of hybrids (*B. napus* × *B. campestris*) by chromosome doubling method. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(4): 1164-1170
- [18] 赵志. 甘白种间杂交选育新型白菜型油菜的研究. 青海大学学报: 自然科学版, 2012, 30(4): 1-6
Zhao Z. Studies on new-type *Brassica rapa* obtained from interspecific cross between *B. napus* and *B. rapa*. Journal of Qinghai University: Natural Science Edition, 2012, 30(4): 1-6
- [19] Qian W, Chen X, Fu D, Zou J, Meng J. Intersubgenomic heterosis in seed yield potential observed in a new type of

- Brassica napus* introgressed with partial *Brassica rapa* genome. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110: 1187-1194
- [20] 文静,熊秋芳,傅廷栋,沈金雄.抗寒甘蓝型油菜的初步选育.湖北农业科学,2012,51(15):3167-3170
Wen J, Xiong Q F, Fu T D, Shen J X. Primary research on breeding of cold resistant *Brassica napus*. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(15): 3167-3170
- [21] 赵志.新型甘蓝型油菜优良性状及杂种优势研究.西宁:青海大学,2007
Zhao Z. The research on heterosis utilization of new-type *B. napus* L.. Xining: Qinghai University, 2007
- [22] 王学芳,田建华,张耀文,张彦锋,李殿荣.甘白杂交创制早熟油菜新种质的研究.中国农学通报,2017,33(32):28-33
Wang X F, Tian J H, Zhang Y W, Zhang Y F, Li D R. New early mature rapeseed germplasms created by *Brassica napus* × *Brassica campestris*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(32): 28-33
- [23] 张晓梅,姚艳梅,徐亮,杜德志.青藏高原早熟甘蓝型春油菜遗传资源研究.植物遗传资源学报,2011,12(3):374-380
Zhang X M, Yao Y M, Xu L, Du D Z. Genetic resources of *Brassica napus* L. strains with early maturity in Qinghai-tibet plateau. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(3): 374-380
- [24] 吴江生,刘后利,周永明,石淑稳.复果油菜新种质的创建和研究.华中农业大学学报,1996,41(6):16-21
Wu J S, Liu H L, Zhou Y M, Shi S W. Creation and researches of polysilique rapeseed new germplasm. Journal of Huazhong Agricultural University, 1996, 41(6): 16-21
- [25] 赵会彦.芥菜型油菜多室基因 *Bjln1* 定位的研究.西宁:青海大学,2014
Zhao H Y. Fine mapping of multilocus gene *Bjln1* in *Brassica juncea* L.. Xining: Qinghai University, 2014
- [26] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijers M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414
- [27] Tautz D. Hypervariability of simple sequence as general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, 1989, 17: 6463-6467
- [28] 何凤仙,肖成汉,赵合句,黄永菊.甘蓝型油菜与芥菜属间杂交新品系的形态及解剖学特征.中国油料作物学报,1996,18(3):27-29
He F X, Xiao C H, Zhao H J, Huang Y J. Anatomical studies on new strain selected from intergeneric hybridization with *Brassica napus* and *Capsella bursa-pastoris*. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1996, 18(3): 27-29
- [29] 孙龙涛.白菜与黑芥种间异源四倍体的获得及其植物学特性研究.杭州:浙江大学,2012
Sun L T. Production of interspecific allotetraploid between *Brassica rapa* and *B. nigra* and its botanical characteristics. Hangzhou: Zhejiang University, 2012
- [30] 乔海云.大白菜与诸葛菜属间杂交及杂种的细胞遗传学分析.北京:中国农业科学院,2009
Qiao H Y. Intergenic hybridization between *B. rapa pekinensis* and *Orychophragmus violaceus* and cytogenetics analysis on the hybrids. Beijing: Chinese Academy Agricultural Sciences, 2009
- [31] 牛妍.芥菜型油菜遗传物质人工渗入白菜型油菜的研究.西宁:青海大学,2014
Niu Y. Studies on artificial introgression of genetic material from *Brassica juncea* into *Brassica rapa*. Xining: Qinghai University, 2014
- [32] 张凤启,程晓辉,刘越英,童超波,董彩华,于景印,黄军艳,刘胜毅.甘蓝型油菜分枝数 QTL 定位及其候选基因预测.中国油料作物学报,2015,37(1):15-20
Zhang F Q, Cheng X H, Liu Y Y, Tong C B, Dong C H, Yu J Y, Huang J Y, Liu S Y. QTL mapping of branch number in *Brassica napus* and candidate gene prediction. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2015, 37(1): 15-20
- [33] 漆丽萍.甘蓝型油菜株型与角果相关性状 QTL 分析.武汉:华中农业大学,2014
Qi L P. QTL analysis for the traits associated with plant architecture and silique in *Brassica napus* L.. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014
- [34] 赵尊康.甘蓝型油菜硼高效基因的定位.武汉:华中农业大学,2013
Zhao Z K. Mapping quantitative trait loci for Boron efficiency in *Brassica napus*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013
- [35] 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.武汉:华中农业大学,2003
Qian W. Studies on intersubgenomic heterosis between *Brassica napus* and *B. rapa*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2003