

# 甘蓝型油菜与埃塞俄比亚芥杂交创制有限花序新种质

涂玉琴<sup>1</sup>, 汤洁<sup>1</sup>, 张洋<sup>1</sup>, 辛佳佳<sup>1</sup>, 涂伟凤<sup>1</sup>, 姬红利<sup>2</sup>, 戴兴临<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>江西省农业科学院作物研究所 / 农业部作物基因资源与种质创制江西科学观测实验站, 南昌 330200;

<sup>2</sup>中国科学院庐山植物园, 江西庐山 332900)

**摘要:** 远缘杂交是作物遗传改良和种质创新的重要途径。本研究通过甘蓝型油菜 ( $2n=38$ , AACC) 与埃塞俄比亚芥 ( $2n=34$ , BBCC) 的种间杂交获得了形态属于两亲本中间型的杂种  $F_1$ , 且表现埃塞俄比亚芥的有限花序特性。该杂种具有预期的体细胞染色体数目 ( $2n=36$ , ABCC), GISH 分析显示含有 8 条 B 染色体组的染色体; 在减数分裂终变期的花粉母细胞中出现多种染色体配对构型, 在后期 I 染色体分离多以 17:19 分离为主, 但在后期 I 及后 II 期均出现大量的落后染色体、染色体桥, 导致花粉败育。将该杂种与亲本甘蓝型油菜品种中双 11 连续回交, 获得有限花序的后代材料  $BC_5F_1$ , 其他形态特征与中双 11 类似, 其体细胞染色体数目恢复至  $2n=38$ , 减数分裂染色体行为也正常; GISH 分析虽检测到少数 B 染色体组信号, 但没有整条的染色体。利用 46 对 B 基因组特异引物对有限花序杂种及后代材料进行 SSR 扩增, 发现在杂种  $F_1$  及部分  $BC_5F_1$  植株中都能检测到 B 基因组特异带, 表明有埃塞俄比亚芥 B 基因组遗传成分的导入。所创建的有限花序新品系为油菜的遗传改良和选育适于机械化作业的新品种提供新材料。

**关键词:** 甘蓝型油菜; 有限花序; 新种质; GISH 分析; 细胞遗传

## Innovation of New Determinate Inflorescence Germplasm via Hybridization between *Brassica napus* and *Brassica carinata*

TU Yu-qin<sup>1</sup>, TANG Jie<sup>1</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, XIN Jia-jia<sup>1</sup>, TU Wei-feng<sup>1</sup>, JI Hong-li<sup>2</sup>, DAI Xing-lin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>The Crops Institute of Jiangxi Academy of Agricultural Sciences/Jiangxi Research Station of Crop Gene Resource & Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, P.R.China, Nanchang 330200; <sup>2</sup>Lushan Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Jiangxi Lushan 332900)

**Abstract:** Distant hybridization is an important approach in crop genetic breeding and germplasm creation. In this study, the  $F_1$  hybrids were produced by interspecific hybridization between *Brassica napus* L. ( $2n=38$ , AACC) and *B. carinata* A. Braun ( $2n=34$ , BBCC), and they showed determinate inflorescence characteristic from *B. carinata* A. Braun and the intermediate morphology of both parents.  $F_1$  hybrids showed the expected chromosomal composition ( $2n=36$ , ABCC) and eight *B. carinata* A. Braun (referred B) chromosomes from by GISH analysis. Their pollen mother cell (PMCs) showed multiple chromosome pairing configuration at diakinesis of meiosis, with main segregation rate of 17 : 19 at anaphase I (A I). A number of lagging chromosomes and chromosomal bridges appeared during A I and A II, which caused pollen abortion. By continuous backcross using its parental line Zhongshuang 11 (*B. napus* L.), the  $BC_5F_1$  lines with determinate inflorescence were obtained and they had similar morphology with Zhongshuang 11. Their somatic chromosomes ( $2n=38$ ) showed

收稿日期: 2019-08-20 修回日期: 2019-10-28 网络出版日期: 2019-11-12

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190820001>

第一作者主要从事油菜遗传育种及远缘杂交种质资源创新研究, E-mail: tuyuqin@aliyun

通信作者: 戴兴临, 主要从事油菜遗传育种及远缘杂交种质资源创新研究, E-mail: dxlgny@163.com

**基金项目:** 国家自然科学基金 (3156100418); 国家重点研发计划子课题 (2016FYD0100202-17); 江西省重点研发计划 (S2016NYZPF0201); 第三次全国农作物种质资源调查与收集行动; 江西省自然科学基金 (20141513010002); 江西油菜产业技术体系首席专家兼育种岗 (JXARS-08)

**Foundation project:** National Natural Science Foundation of China (3156100418), Sub Projects of National Key R & D Projects (2016FYD0100202-17), Key R & D Programs in Jiangxi (S2016NYZPF0201), Third National Survey and Collection of Crop Germplasm, Jiangxi Natural Science Foundation (20141513010002), Chief Expert and Breeding Post of Rape Industry Technology System in Jiangxi (JXARS-08)

normal programmed meiosis, and only minor B chromosome signals but whole chromosomes were detected by GISH analysis. By marker assisted detection using 46 pairs of B genome specific SSR primers, B genome specific bands are detectable in  $F_1$  hybrid and a few of  $BC_3F_1$ . This result indicated that the chromosomal segments of *B. carinata* A. Braun were successfully introduced into *B. napus* L. Thus, a number lines with new determinate inflorescence will become useful in rapeseed breeding for new varieties suitable for mechanized operation.

**Key words:** *Brassica napus* L.; determinate inflorescence; new germplasm; GISH analysis; cytogenetics

油菜是我国第一大油料作物,年均种植面积和总产量均居世界首位<sup>[1]</sup>。我国现在大面积栽培的甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.,  $2n=38$ , AACC)于20世纪三四十年代从国外引进,遗传变异较为匮乏,而甘蓝型油菜所属的芸薹属遗传资源非常丰富,其间蕴含大量的优异基因,至今已通过远缘杂交等方式将芸薹属及其近缘种中的抗旱、抗虫、抗病、耐盐碱等优异特性基因成功转移到甘蓝型油菜中<sup>[2]</sup>。因此,通过远缘杂交转移利用有利基因是甘蓝型油菜遗传改良和新种质创制的重要途径<sup>[3-4]</sup>。

油菜为无限花序,花期较长(一般持续1个月左右),使得油菜植株不同层次的角度成熟时间不一致,收获过早,上部角果未成熟,影响产量形成和种子品质,收获过晚,下部角果易开裂,机械收获损失大<sup>[5]</sup>。且在油菜生长后期,无限花序常致使花序顶部角果无法正常发育导致角果不成熟,种子干瘪甚至花序败育形成无效花序或无效果轴,增加了油菜生物量的无效消耗,降低了油菜产量潜力的发挥。因此,有限花序新种质的创制、挖掘与利用是解决油菜无限花序带来的问题的材料基础和有效途径。芸薹属埃塞俄比亚芥(以下简称“埃芥”)在花序发育到一定程度后,其花序顶端会自动形成顶生花而终止花序生长(图1),是一个重要的有限花序基因源,且埃芥具有分枝旺盛、抗病(抗黑胫病、白锈病、霜霉病及萎蔫病等多种病害)、抗逆性强等特性<sup>[6]</sup>,是甘蓝型油菜遗传改良的优异基因源。因此,开展甘蓝型油菜与埃芥远缘杂交,转移有限花序基因及其他优异基因,对甘蓝型油菜遗传改良具有重要的意义。

目前,关于有限花序变异研究已经在拟南芥<sup>[7-8]</sup>、金鱼草<sup>[9-10]</sup>、烟草<sup>[11]</sup>、水稻<sup>[12]</sup>、豌豆<sup>[13]</sup>、大麦<sup>[14]</sup>、芝麻<sup>[15]</sup>以及大豆<sup>[16]</sup>等30余种植物中得到广泛而深入的研究。然而在油菜中,有关有限花序材料的创制和研究报道较少。Bansal等<sup>[17]</sup>通过甘蓝型油菜与埃塞俄比亚芥进行杂交,在人工合成的芥菜型油菜(*B. juncea*,  $2n=34$ , AABB)自交后代中首次发现有限花序植株,对该有限花序后代进行了农艺性状潜力的评估,开展了该有限花序基因的定

位<sup>[18]</sup>。Li等<sup>[19]</sup>利用春性甘蓝型油菜与冬性甘蓝型油菜杂交,通过小孢子培养获得有限花序植株,遗传分析表明该有限花序性状受1对隐性基因控制,将其定位在A10染色体上。本研究中,通过甘蓝型油菜与埃芥进行种间杂交,首次将埃芥天然的有限花序基因转移到甘蓝型油菜中,创制出甘蓝型油菜有限花序新种质,并对杂种及后代进行形态学鉴定,创制一批遗传稳定的有限花序新材料;同时对该有限花序杂种及外源渗入系进行细胞遗传分析和分子鉴定,为甘蓝型油菜的遗传改良和选育适于机械化作业的油菜新品种提供了新材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

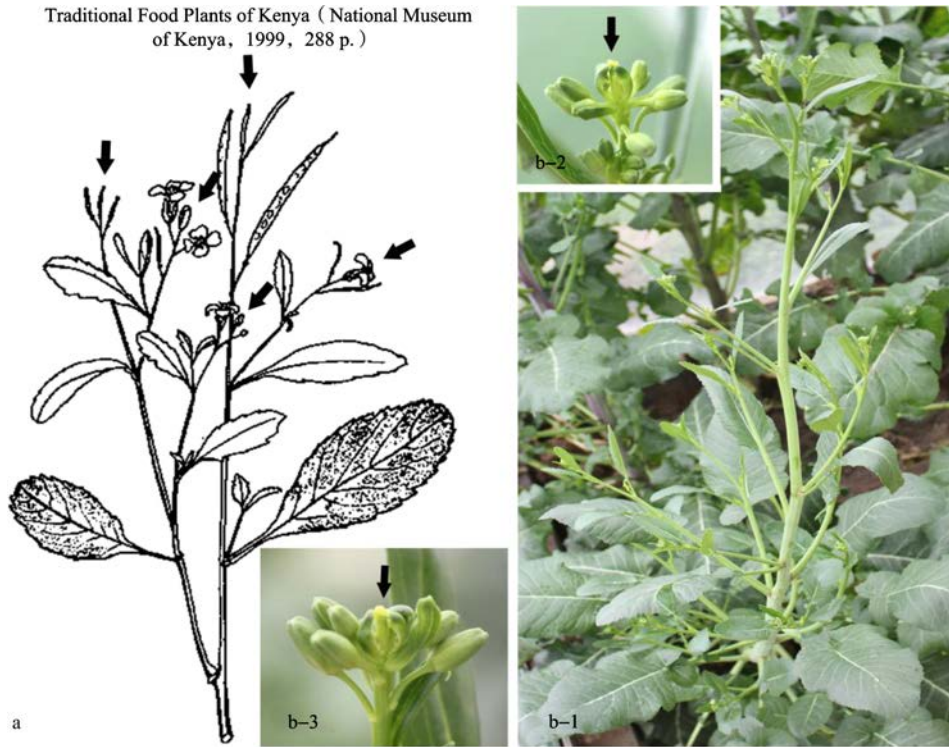
以甘蓝型油菜品种中双11号为母本,以埃芥(*B. carinata* A. Braun,  $2n=36$ , BBCC)为父本进行种间杂交,经过大量去雄,多次重复授粉,获得杂种 $F_1$ ,用中双11作轮回亲本,不断进行回交构建 $BC_3F_1$ 群体作为试验材料。其中,中双11号为甘蓝型油菜常规品种,由中国农业科学院油料作物研究所提供,为无限花序;埃芥为本实验室多年保存的高代自交系,为天然的有限花序(图1)。

### 1.2 细胞学观察

细胞学观察:在开花初期取幼嫩子房,用2 mmol/L的8-羟基喹啉于室温下处理3~4 h,后置于卡诺固定液(乙醇:冰醋酸=3:1)固定24 h以上,用于有丝分裂观察;取幼嫩花蕾,用卡诺固定液固定,并更换新鲜固定液几次,直至花蕾颜色泛白,用于减数分裂观察。固定的子房和花蕾更换新鲜的卡诺固定液后,于-20℃保存。有丝分裂和减数分裂的观察方法按照Li等<sup>[20]</sup>的操作方法进行。

### 1.3 花粉育性观察

在晴天取当天开放的花,将花药置于玻片上,于1%醋酸洋红液中挤出花粉使其染色,去掉花药后盖片,普通光学显微镜下观察计数(统计300~500个花粉粒),大而圆的为可育花粉,小而瘪的为不育花粉,并计算花粉的可染率(%),即可育花粉数占观察总花粉个数的百分比。



a: 肯尼亚博物馆绘制的埃芥形态图, 箭头所示为花序顶端生长的花蕾、花或角果; b: 埃芥有限花序形态, b-1: 植株, b-2, 3: 花序顶端分化成花的放大图 (黑色箭头所示)

a: The morphological map of *B. carinata* A. Braun drawn by Kenya Museum, arrows are flower buds, flowers or pod at the tip of inflorescence, b: Determinate inflorescence morphology of *B. carinata* A. Braun, b-1: plant, b-2, 3: Inflorescence tip differentiated into flower (black arrow shows)

图 1 埃塞俄比亚芥有限花序的形态

Fig.1 Morphology of determinate inflorescence of *B. carinata* A. Braun

#### 1.4 分子标记

基因组 DNA 的提取, 参照 Doyle 等<sup>[21]</sup>的方法, 采用 CTAB 小样法提取。本研究用 B 基因组特异引物<sup>[22]</sup>进行 SSR 标记检测, 扩增程序: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 10 个循环 (每个循环退火温度降 0.7 °C); 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min<sup>[23]</sup>。

#### 1.5 探针标记与染色体准备

利用 B 基因组特异的着丝粒 DNA (pBNBH35 特异重复序列), 按照 Schelfhout 等<sup>[24]</sup>的方法进行 PCR 扩增, 扩增产物用做检测 B 基因组染色体的探针, 采用切口平移法标记, 探针片段的长度大约 500 bp, 反应体系: 10 × buffer 5 μL、dNTP 5 μL、DNase I (0.005U) 2 μL、DNApoly I 1.2 μL、Bio-11-dUTP 1.2 μL、DNA (100 ng/μL) 5 μL、ddH<sub>2</sub>O 30.6 μL; 用甘蓝型油菜基因组 DNA, 在开水中煮沸 15 min 左右用做封阻长度大约 300~500 bp。染色体制片参照 Zhong 等<sup>[25]</sup>的法。

#### 1.6 原位杂交

原位杂交的程序按照葛贤宏<sup>[26]</sup>和 Wang 等<sup>[27]</sup>的方法进行。将准备原位杂交的染色体制片在 37 °C

烘箱中 12 h 以上, 用 5 ng/μL 的胃蛋白酶处理 (37 °C, 20 min), 100 ng/μL 的 RNase 酶解 (37 °C, 1 h), 4% 多聚甲醛处理 10 min, 每个过程在 2 × SSC 中摇洗 3 次, 每次 5 min, 然后进行梯度脱水 (75% 乙醇 3 min, 100% 乙醇 3 min), 干燥 1 h 以上。将配好的杂交液 (每片 50 μL: 50% 去离子甲酰胺 25 μL、20 × SSC 5 μL、鲑鱼精 DNA 0.5 μL、10 × SDS 2.5 μL、50% 硫酸葡聚糖 10 μL、B 基因组特异探针 3 μL、油菜封阻 DNA 4 μL), 于 85 °C 变性 10 min, 冰上冷却 5 min。然后将杂交液均匀滴在玻片中间, 盖膜, 于原位 PCR 仪 80 °C 共变性 5 min, 37 °C 湿盒温育过夜。次日将杂交后的玻片于 20% 甲酰胺中洗脱 (42 °C, 10 min), 2 × SSC (42 °C, 2 × 5 min), 2 × SSC (室温, 5 min), 然后每片加 5% BSA 100 μL/片, 盖膜室温放置 5 min。避光: 加 5% BSA 稀释 Cy3 100 倍, 配置 Cy3 耦连的链亲和素, 50 μL/片, 盖膜, 37 °C 温育 1 h, 1 × PBS 中摇 5 min, 每片滴加 4 μg/mL DAPI 100 μL, 盖膜, 室温 30 min, 1 × PBS 中揭膜, 每片加抗荧光猝灭剂 1 滴, 用干净的盖片盖好, 4 °C 避光保存, 待荧光显微镜下观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘蓝型油菜有限花序新材料的获得及形态学观察

以甘蓝型油菜品种中双 11 为母本,以埃芥为父本进行种间杂交,经过大量的人工去雄和授粉,获得一定量的种子,于下半年经培养皿发芽后点播于营养钵中育苗,至 5 片叶时移栽入大田,形成  $F_1$  植株。 $F_1$  植株在大田长势比较旺盛,植株整体形态介于两个亲本之间(图 2b),叶片浅绿色,叶缘和叶裂形态与母本中双 11 类似,植株茎秆紫色,与埃芥类似,分枝与分枝角度也类似于埃芥, $F_1$  植株的花序均属于有限花序,花序的大小介于两亲本之间,主茎和分枝的花序顶端发育到一定程度均发育成一朵花,其顶

生花瓣缺失,花药退化,子房膨大,从而终止无限花序转变成有限花序(图 2b1),且在开花后大多自然凋谢脱落,少数能够形成角果,一般只有角果皮而无种子,与父本埃芥类似。经花粉育性检测发现所有杂种植株花药萎缩干瘪,天气晴朗气温较高时,有极少量的花粉,取花药镜检,发现这些  $F_1$  杂种均为败育的,极少量的花粉也是无活力的。由此,用中双 11 号与其回交,需要经过大量的辅助授粉才能获得  $BC_1F_1$  种子,同样经过培养皿发芽,营养钵育苗,再移栽至大田, $BC_1F_1$  植株长势较好,且花序性状发生分离,部分植株为无限花序,部分为有限花序,带有有限花序的植株形态较  $F_1$  杂种更偏向母本甘蓝型油菜,但茎秆和叶片呈现淡紫色(图 2d1),花序顶端发育成一个或几个顶生花,其花瓣缺失,花药褐



a: 甘蓝型油菜亲本; a1: 无限花序形态; b: 杂种  $F_1$ , b1: 杂种  $F_1$  有限花序形态; c: 埃芥, c1: 埃芥有限花序形态;  
d~f: 染色体稳定在  $2n=38$  的后代材料 (1: 植株, 2: 花序顶端局部图, 与埃芥类似)  
a: *B. napus* L. plant, a1: Indeterminate inflorescence of *B. napus* L., b: Hybrid  $F_1$  plant, b1: Limited inflorescence of hybrid  $F_1$ ,  
c: *B. carinata* A. Braun plant, c1: Limited inflorescence of *B. carinata* A. Braun, d~f: Morphology of progenies ( $2n=38$ ) with determinate  
inflorescence from *B. napus* L.  $\times$  *B. carinata* A. Braun (1: plant, 2: top part of inflorescence) the same to of *B. carinata* A. Braun

图 2 甘蓝型油菜与埃芥杂种  $F_1$  及有限花序后代的形态学

Fig.2 Morphology of  $F_1$  and progenies with determinate inflorescence from *B. napus* L.  $\times$  *B. carinata* A. Braun cross

化,柱头膨大,且有时存在2、3个柱头粘连在一起成不规则状。但是,经花粉育性检测,该 $BC_1F_1$ 植株的花粉育性已部分恢复,因此,选择带有有限花序的植株,继续用中双11号作为轮回亲本对其进行回交,每次回交都选择具有有限花序的后代作为回交对象,分别获得 $BC_2F_1$ ~ $BC_3F_1$ (图2e、f),以期构建有限花序性状的外源渗入系,为有限花序性状后期的定位准备遗传分析群体。在与中双11号连续回交的过程中发现,不仅每个回交世代的花粉育性逐渐恢复,后代的植株形态也更偏向母本甘蓝型油菜,叶色深绿,株型紧凑,且后代植株的有限花序的表型也趋于正常(图2e、f),花蕾数目增多,花序顶端多

发育成多个膨大或发育畸形的子房结束花序的发育进程,变成有限花序。经过花粉育性检测, $BC_5F_1$ 植株的花粉育性已基本恢复正常。如图3所示,收获时该有限花序外源渗入系 $BC_5F_1$ ,从表型看,结实正常,其角果大小、角果密度与母本相近,但该有限花序外源渗入系主茎与分枝顶端角果均为有效角果,角果饱满、成熟度较为一致,且该有限花序外源渗入系分枝属中上部分枝,植株形态较母本甘蓝型油菜更为紧凑(图3)。因此,该有限花序外源渗入系,不仅为甘蓝型油菜有限花序的遗传改良提供了新材料,也为有限花序性状转育,选育适合当前育种目标的新品种提供了新型材料。



a: 甘蓝型油菜无限花序角果; b: 有限花序角果形态; c: 甘蓝型油菜终花植株(无限花序); d: 外源渗入系终花植株(有限花序)  
a: Indeterminate inflorescence pod of *B. napus* L., b: determinate inflorescence pod of near-isogenic line, c: Terminal flower plant of *B. napus* (indeterminate inflorescence), d: Terminal flower plant of foreign introgression line (determinate inflorescence)

图3 有限花序外源渗入系与甘蓝型油菜角果与植株形态比较

Fig.3 Morphology of pod and plant of foreign introgression lines with determinate inflorescence from *B. napus* L. × *B. carinata* A. Braun

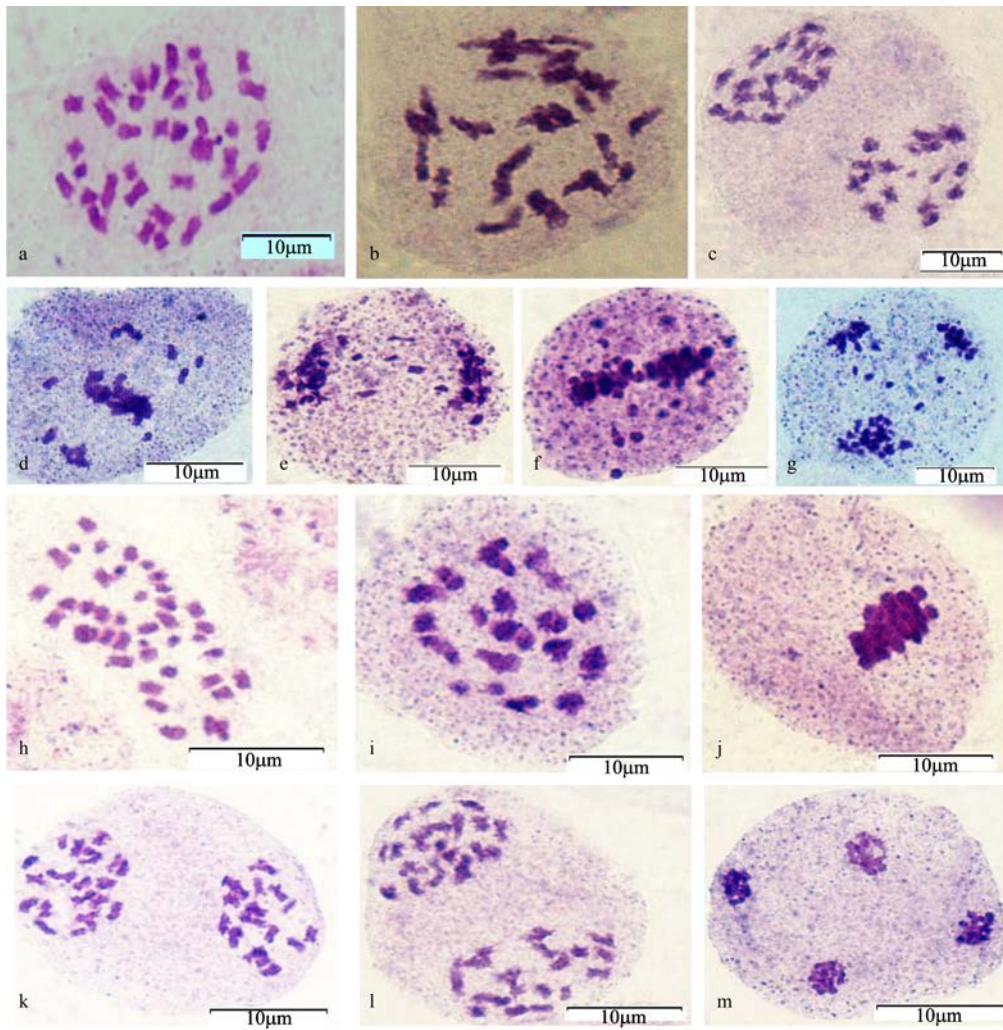
## 2.2 有限花序新材料的细胞学鉴定

通过甘蓝型油菜与埃芥进行种间杂交,将获得的有限花序杂种 $F_1$ 进行细胞学鉴定,经有丝分裂观察,该杂种 $F_1$ 体细胞染色体数目为 $2n=36$ (图4a),为甘蓝型油菜和埃芥配子染色体数之和,经减数分裂观察发现,该有限花序杂种减数分裂染色体行为发生紊乱,在减数分裂的终变期,大多出现以二价体

配对,单价体、三价体和四价体也多有存在(图4b),减数分裂后期I,染色体分离多以17:19分离为主(图4c),少数细胞也出现18:18分离,在中期I、后期I、中期II、后II期均出现大量的染色体落后,形成染色体桥(图4d、e、f、g)。采用中双11作轮回亲本,选取有限花序植株进行不断回交,对获得的回交后代 $BC_5F_1$ 进行有丝分裂观察,其体细胞

染色体数目恢复至  $2n=38$  (图 4h), 减数分裂观察发现, 终变期染色体配对基本正常, 极少数出现单价体 (图 4i), 后期 I 多以 19:19 分离 (图 4l), 极少出现 20:18 分离 (图 4k), 中期 I、后期 I、后期 II 染色体行为恢复正常, 基本不出现染色体落后、染色体桥的现象 (图 4j、k、l、m), 这表明该有限花序外源渗入系  $BC_5F_1$  基因组基本稳定。同时, 利用 B 基因组着丝粒区 pBNBH35 特异重复序列做探针, 分别对埃芥、有限花序杂种  $F_1$  及外源渗入系  $BC_5F_1$  进行基

因组原位杂交 (GISH, genomic in situ hybridization) 分析, 结果显示, 在埃芥的花粉母细胞终变期检测到 16 个 B 基因组特异信号 (图 5A), 有限花序杂种  $F_1$  的减数分裂终变期检测到 8 个 B 基因组特异信号 (图 5B), 且在外源渗入系  $BC_5F_1$  减数分裂末期 II 也检测多个 B 基因组的特异信号 (图 5C), 由此进一步说明本研究成功地将埃芥基因组导入到甘蓝型油菜中, 且该有限花序杂种的获得为甘蓝型油菜种质创新和优异性状的改良提供了新材料。

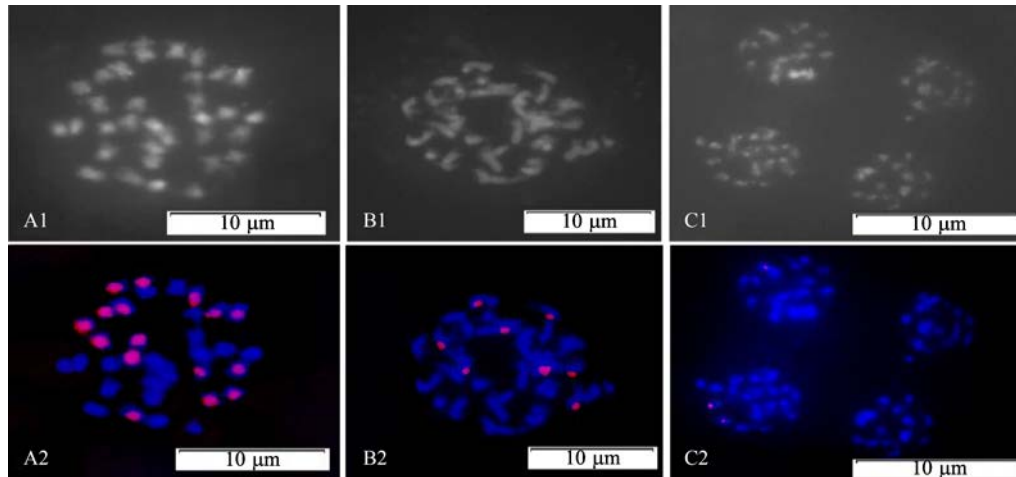


a: 杂种  $F_1$  体细胞染色体 ( $2n=36$ ); b: 杂种  $F_1$  减数分裂终变期染色体配对 (以二价体配对为主); c: 减数分裂后 I 期 17:19 分裂; d~g: 中 I 期、后 I 期、中 II 期、后 II 期均出现染色体落后; h: 外源渗入系 ( $BC_5F_1$ ) 体细胞染色体 ( $2n=38$ ); i: 外源渗入系减数分裂终变期染色体配对 (二价体配对); k, l: 后 I 期分别以 20:18, 19:19 分离; j~m: 中 I 期、后 I 期、末 II 期染色体行为正常, 未出现染色体落后

a: Somatic chromosome of hybrid  $F_1$  ( $2n=36$ ), b: Chromosome pairing in meiosis diakinesis (bivalent pairing mainly), c: 17:19 segregation in meiosis anaphase I (AI), d~g: Chromosome lag in metaphase I (MI), AI, MII, AII; h: Somatic chromosome of foreign introgression line ( $2n=38$ ), i: Chromosome pairing in meiosis diakinesis of foreign introgression line (bivalent pairing), k, l: 20:18 and 19:19 segregation in AI, respectively, j~m: Normal chromosomes behaviors without chromosome lag in MI, AI and telophase II (TII)

图 4 甘蓝型油菜与埃芥有限花序杂种  $F_1$  与外源渗入系细胞学鉴定

Fig.4 cytological identification of hybrid  $F_1$  and foreign introgression line with determinate inflorescence from *B. napus* L.  $\times$  *B. carinata* A. Braun



1: DAPI 染色; 2: 探针标记的信号与 DAPI 染色的组合; A: 埃芥体细胞, 16 条 B 染色体; B: 杂种  $F_1$  花粉母细胞减数分裂终变期, 8 条 B 基因组染色体; C:  $BC_3F_1$  减数分裂末 II 期, 未检测到完整 B 基因组染色体, 红色信号表示 B 基因组染色体

1: DAPI images, 2: merged images, A: somatic cell of *B. carinata* A. Braun with 16 B chromosomes, B: hybrid  $F_1$  PMC at diakinesis with 8 chromosomes, C:  $BC_3F_1$  PMC at TII without whole B chromosomes, the red signals show B chromosomes

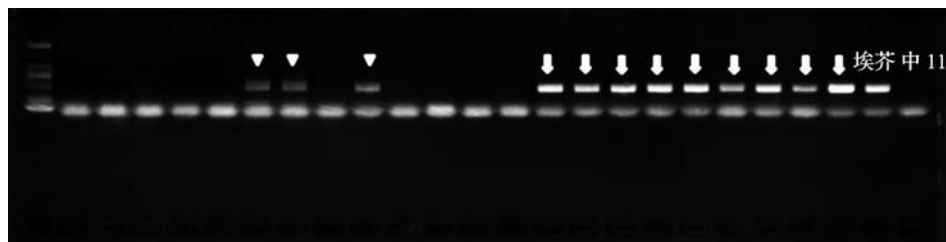
图 5 甘蓝型油菜与埃芥有限花序杂种  $F_1$  及外源渗入系原位杂交分析

Fig.5 GISH analysis of hybrid  $F_1$  and foreign introgression line with determinate inflorescence from *B. napus* L.  $\times$  *B. carinata* A. Braun cross

## 2.4 有限花序材料的 SSR 标记分析

随机选取携带有限花序性状的  $F_1$  杂种和外源渗入系  $BC_3F_1$  各 11 株, 采用 CTAB 小样法提取 DNA, 用 46 对 B 基因组特异引物对两亲本进行 SSR 扩增, 进行特异性筛选, 结果发现 13 对特异引物具有多态性, 该 13 对引物分别为 sJ4933、sJ84165、sJ7079、sB4817R、sJ7046、sB1990F、sA0306、sB2141AI、sJ7104、sJ1505、sB1728、

sJ34121 和 sJ1668I, 据 Yang 等<sup>[28]</sup> 研究显示, 该 13 对特异引物分布在 B1、B2、B3、B4、B6 和 B8 连锁群上。再利用这 13 对引物对所获得的杂种  $F_1$  和  $BC_3F_1$  后代进行特异性检测, 结果发现在杂种  $F_1$  及部分  $BC_3F_1$  植株中都能检测到 B 基因组特异带 (图 6), 说明获得的有限花序杂种和外源渗入系中携带有 B 基因组的特异片段, 且来自多条 B 基因组染色体。



↓: 杂种  $F_1$  B 基因组特异带; ▽: 外源渗入系 B 基因组特异带

↓: B genome specific bands from hybrid  $F_1$ , ▽: B genome specific bands from foreign introgression line

图 6 杂种  $F_1$  及有限花序外源渗入系 B 基因组特异引物 sB1990F 的 SSR 特异性检测

Fig.6 SSR Specific detection of hybrid  $F_1$  and foreign introgression line with limited inflorescence from *B. napus* L.  $\times$  *B. carinata* A. Braun with B genome specific primer sB1990F

## 3 讨论

在我国, 油菜是继水稻、玉米、小麦、大豆之后的第五大作物, 也是第一大油料作物<sup>[29]</sup>。而油菜在我国生产水平低, 传统生产技术普遍存在, 劳动强度大, 劳动力投入多, 机械化程度低, 严重影响油菜生产的经济效益, 限制了生产规模的持续扩大<sup>[1]</sup>。机

械化作业是降低种植成本、提高油菜生产效益, 扩大生产规模的的重要途径之一。本研究创制的有限花序渗入系, 其花序生长到一定程度时, 在植株的顶端形成 1 朵或 1 簇花停止生长, 不仅能缩短花期, 减少由无限花序带来的生物量的无效消耗, 而且角果成熟度较为一致, 有利于确定适宜的收获时间, 减少收获的机械损失。与无限花序的甘蓝型油菜相比, 克

服了无限花序花期长、角果成熟时间不一致对油菜机械化收获的影响,为选育适合机械化作业的新品种提供新材料,突破了油菜缺少适合全程机械化作业品种的瓶颈,也为油菜有限花序的遗传基础研究提供了材料基础。远缘杂交是作物遗传改良和种质创新的重要途径,埃芥是一个天然的有限花序基因源(图1),本研究通过甘蓝型油菜与埃芥进行种间杂交,首次获得植株形态介于两个亲本之间,且花序顶端表现为有限花序性状的杂种,创制了携带有限花序性状的甘蓝型油菜新材料。与 Bansal 等<sup>[17]</sup>在人工合成的芥菜型油菜自交后代中发现的有限花序植株来源不同,将获得的有限花序杂种进行细胞学鉴定,发现其体细胞染色体数目为预期的  $2n=36$ ,即体细胞染色体数目为甘蓝型油菜与埃芥配子染色体数目之和,根据两亲本的基因组组成,可推测该杂种基因组成为 ABCC,利用 B 基因组特异序列做探针, GISH 分析显示含有 8 个 B 基因组染色体信号,解蓓<sup>[30]</sup>利用 B 基因组特异序列做探针,可精确识别埃芥的每条 B 基因组染色体,说明本研究已将埃芥的 8 条 B 基因组染色体全部导入有限花序杂种  $F_1$  中,与推测的基因组组成相吻合。据此,由于该有限花序杂种基因组中含有 8 条 B 染色体,使得杂种在减数分裂过程中,染色体行为极其紊乱,在终变期出现大量的单价体、二价体、三价体甚至四价体,且在后 I、后 II、中 I、中 II 期出现大量的染色体落后、染色体桥,这可能是导致杂种完全败育的真正原因。利用甘蓝型油菜与杂种连续多次回交,获得有限花序外源渗入系  $BC_5F_1$ ,其花粉育性恢复正常,其体细胞染色体数目恢复  $2n=38$ ,其减数分裂配对和分离均表现正常, GISH 分析未检测到整条染色体,为该外源渗入系花粉育性和结实率均恢复正常提供了细胞学基础。另外,本研究还利用 46 对已有的 B 基因组特异引物对两个亲本和该有限花序杂种  $F_1$  及外源渗入系进行 SSR 检测,结果发现在 13 对引物中检测到 B 基因组特异带,由此说明通过与甘蓝型油菜多次回交,杂种基因组中 B 染色体与 A、C 染色体进行了大量的基因组重组<sup>[26]</sup>,导致 B 基因组的 DNA 片段有较高频率的渗入甘蓝型油菜中,结合 Tan 等<sup>[31]</sup>研究,这些导入的 B 基因组的 DNA 片段,这其中也很可能包括决定有限花序性状的基因,为今后的遗传定位和基因克隆作参考信息。

#### 参考文献

[1] 范成明,田建华,胡赞民,王珏,吕慧颖,葛毅强,魏珣,邓向

东,张蕾颖,杨维才.油菜育种行业创新动态与发展趋势.植物遗传资源学报,2018,19(3):447-454

Fan C M, Tian J H, Hu Z M, Wang J, Lv H Y, Ge Y Q, Wei X, Deng X D, Zhang L Y, Yang W C. Advances of oilseed rape breeding. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(3): 447-454

[2] 姚行成,杜雪竹,李再云.芸薹属栽培种与近缘种的远缘杂交及进展.华中农业大学学报,2006,25(6):693-705

Yao X C, Du X Z, Li Z Y. Advance in wide hybridizations between the cultivated *Brassica* speices and their relatives. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 25(6): 693-705

[3] 李再云.油菜育种新材料的创造和利用.作物育种信息,2006(6):3-5

Li Z Y. Creation and utilization of new materials for rape breeding. Crop Breeding Information, 2006(6): 3-5

[4] 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

[5] 傅廷栋.油菜生产品种改良与机械化.农业装备技术,2010,36(2):22-25

Fu T D. Improvement and mechanization of rapeseed varieties. Agricultural Equipment & Technology, 2010, 36(2): 22-25

[6] 江莹芬,胡宝成,陈凤祥,李强生,孟金陵.埃塞俄比亚芥研究进展.作物杂志,2011(6):6-9

Jiang Y F, Hu B C, Chen F X, Li Q S, Meng J L. Research advances on ethiopian mustard (*Brassica carinata*). Crops, 2011(6): 6-9

[7] Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters A J M, Soppe W. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998, 49: 345-370

[8] Conti L, Bradley D. TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. Plant Cell, 2007, 19: 767-778

[9] Bradley D, Carpenter R, Copsey L, Vincent C, Rothstein S, Coen E. Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. Nature, 1996, 379: 791-797

[10] Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. Science, 1997, 275: 80-83

[11] Amaya I, Ratcliffe O J, Bradley D J. Expression of CENTRORADIALIS (CEN) and CEN-like genes in tobacco reveals a conserved mechanism controlling phase change in diverse species. Plant Cell, 1999, 11: 1405-1417

[12] Nakagawa M, Shimamoto K, Kyojuka J. Overexpression of RCN1 and RCN2, rice TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice. The Plant Journal, 2002, 29: 743-750

[13] Foucher F, Morin J, Courtiade J, Cadiou S, Ellis N, Banfield M J, Rameau C. DETERMINATE and LATE FLOWERING are two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs



- that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell*, 2003, 15: 2742-2754
- [ 14 ] Kikuchi R, Kawahigashi H, Ando T, Tonooka T, Handa H. Molecular and functional characterization of PEBP genes in barley reveal the diversification of their roles in flowering. *Plant Physiology*, 2009, 149: 1341-1353
- [ 15 ] Zhang H Y, Miao H M, Li C, Wei L B, Duan Y H, Ma Q, Chang S X. Ultra-dense SNP genetic map construction and identification of *SiDt* gene controlling the determinate growth habit in *Sesamum indicum* L.. *Scientific Reports*, 2016, doi: 10.1038/s41598-017-02405-9
- [ 16 ] Tian Z X, Wang X B, Lee R, Li Y H, Specht J E, Nelson R L, McClean P E, Qiu L J, Ma J X. Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *Proceedings of the National Academy Science USA*, 2010, 107: 8563-8568
- [ 17 ] Bansal P, Kaur P, Banga S K, Banga S S. Augmenting genetic diversity in *Brassica juncea* through its resynthesis using purposely selected diploid progenitors. *International Journal of Plant Breeding*, 2009, 3: 41-45
- [ 18 ] Kaur H, Banga S S. Discovery and mapping of *Brassica juncea* *Sdt1* gene associated with determinate plant growth habit. *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, 128(2): 235-245
- [ 19 ] Li K X, Yao Y M, Xiao L, Zhao Z G, Guo S M, Fu Z, Du D Z. Fine mapping of the *Brassica napus* *Bnsdt1* gene associated with determinate growth habit. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(1): 193-208
- [ 20 ] Li Z, Liu H, Luo P. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91: 131-136
- [ 21 ] Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 11-15
- [ 22 ] Chen S, Wan Z, Nelson M N, Chanhhan J S, Redden R, Burton W A, Lin P, Salisbury P A, Fu T, Cowling W A. Evidence from genomewide simple sequence repeat markers for a polyphyletic origin and secondary centers of genetic diversity of *Brassica juncea* in China and India. *Journal of Heredity*, 2013, 104: 416-427
- [ 23 ] 杨汉, 康雷, 李鹏飞, 葛贤宏, 李再云. 甘蓝型油菜-菘蓝二体附加系的创制和细胞学分析. *中国油料作物学报*, 2016, 38(3): 281-286
- Yang H, Kang L, Li P F, Ge, X H, Li Z Y. Development and cytology of disomic alien addition between *Brassica napus* and *Isatis indigotiga*. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2016, 38(3): 281-286
- [ 24 ] Schelfhout C, Snowdon R, Cowling W, Wroth J. A PCR based B-genome-specific marker in *Brassica* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 917-921
- [ 25 ] Zhong X B, de Jong J H, Zabel P. Preparation of tomato meiotic pachytene and mitotic metaphase chromosomes suitable for fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosome Research*, 1996, 4: 24-28
- [ 26 ] 葛贤宏. 人工合成芸薹属异源六倍体与诸葛菜属间杂种的细胞学及分子生物学研究. 武汉: 华中农业大学, 2007
- Ge X H. Molecular and cytogenetic characterizations on hybrids between synthetic *Brassica* allohexaploid and *orychophragmus violaceus*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007
- [ 27 ] Wang Y, Zhao X X, Sonntag K, Wehling P, Snowdon R J. Behaviour of *Sinapis alba* chromosomes in a *Brassica napus* background revealed by genomic in-situ hybridization. *Chromosome Research*, 2005, 13: 819-826
- [ 28 ] Yang S, Chen S, Geng X X, Yan G, Li Z Y, Meng J L, Cowling W A, Zhou W J. The first genetic map of a synthesized allohexaploid *Brassica* with A, B and C genomes based on simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129: 689-701
- [ 29 ] 沈金雄, 傅廷栋. 我国油菜生产、改良与食用油供给安全. *中国农业科技导报*, 2011, 13(1): 1-8
- Shen J X, Fu T D. Rapeseed production, improvement and edible oil supply in China. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 13(1): 1-8
- [ 30 ] 解蓓. 埃塞俄比亚芥和芥菜型油菜全套染色体精确识别. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016
- Jie B. Karyotype and identification of each chromosome of *Brassica carinata* and *Brassica juncea*. Hohhot: Inner Mongolia University, 2016
- [ 31 ] Tan C, Cui C, Xiang Y, Ge X H, Li Z Y. Development of *Brassica oleracea-nigra* monosomic alien addition lines: genotypic, cytological and morphological analyses. *Theoretical and Applied Genetics*, 2017, 130(12): 2491-2504