

甘蓝型油菜与 *Brassica maurorum* 的异源
六倍体后代及 BC₂ 细胞学分析

姚行成^{1,2}, 葛贤宏¹, 李再云^{1*}

(1. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北 武汉, 430070; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南 儋州, 571737)

摘要:将甘蓝型油菜品种中油 821 (2n = 38, AACC) 与芸薹属野生资源 *Brassica maurorum* (2n = 16, MM) 的三倍体杂种进行染色体加倍, 得到异源六倍体 (2n = 54, AACCM)。该多倍体雄性高度不育, 雌性育性极低。在其花粉母细胞的减数分裂终变期, 染色体平均配对构型为 1. 17 I + 20. 71 II + 0. 56 III + 2. 25 IV + 0. 08 V + 0. 06 VI。用甘蓝型油菜与该多倍体连续回交 2 次, 均需借助幼胚培养才得到后代植株, BC₁、BC₂ 植株均雄性不育, 雌性育性很低。BC₂ 植株的形态特征接近甘蓝型油菜, 但各植株形态有明显差异。基因组原位杂交分析表明, BC₂ 植株含有 2~5 条 M 基因组的染色体, 甘蓝型油菜染色体多配对形成二价体, 附加的染色体多以单价体形式存在, 或与甘蓝型油菜染色体发生联会配对。

关键词:甘蓝型油菜; *Brassica maurorum*; 多倍体; 基因组原位杂交

中图分类号: S565. 403 文献标识码: A 文章编号: 1007 - 9084 (2012) 01 - 0016 - 05

Cytology of *Brassica allohexaploids* and BC₂ progenies from *B. napus* and *B. Maurorum*

YAO Xing - cheng^{1,2}, GE Xian - hong¹, LI Zai - yun^{1*}

(1. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. China Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: Allohexaploids (2n = 54, AACCM) plants from *Brassica napus* cv. Zhongyou 821 (2n = 38, AACC) and wild species *B. maurorum* (2n = 16, MM) were produced by hybrids chromosome doubling. The polyploids were totally male sterile and extremely low female fertile. In polyploids pollen mother cells at diakinesis, the mean chromosome pairing configuration was 1. 17 I + 20. 71 II + 0. 56 III + 2. 25 IV + 0. 08 V + 0. 06 VI. BC₁ and BC₂ from polyploids and Zhongyou 821 were only obtained by embryo rescue, and they were both male sterile and low fertility for female. The BC₂ plants were morphologically diverse but similar to *B. napus*. Genomic in situ hybridization (GISH) analysis showed that BC₂ plants remained 2~5 M - genome chromosomes from *B. maurorum*, and chromosomes from *B. napus* mainly formed bivalents. In BC₂ populations, the additional chromosomes frequently appeared as univalents or paired with *B. napus* chromosomes.

Key words: *Brassica napus*; *Brassica maurorum*; Polyploids; Genomic in situ hybridization

甘蓝型油菜 (*Brassica napus*, 2n = 38, AACC) 是一种重要的油料作物, 在我国广泛种植。生产对油菜新品种的要求越来越高, 而现有的甘蓝型油菜品种内可利用的病虫害抗性基因资源有限, 难以实现多种育种目标。栽培油菜在芸薹属内有许多近缘种, 遗传资源很丰富^[1]。*B. maurorum* 是芸薹属的一

个野生资源, 具有抗甘蓝蚜虫、甘蓝根部的飞蝇、白锈和黑斑病的特点^[2]。*B. maurorum* 与芸薹属栽培种的杂交及相应的染色体组间的亲缘关系已有报道^[3~5]。它与芸薹属的杂种 F₁ 均表现为雄性和雌性高度不育, 不能通过 F₁ 实现基因转移。利用不育的 F₁ 合成异源多倍体, 育性可得以不同程度的恢

收稿日期: 2011-10-17
基金项目: 作物遗传改良国家重点实验室专项
作者简介: 姚行成 (1980 -), 博士, 主要从事作物遗传育种研究, E - mail: singchenyao@163. com
* 通讯作者: 李再云, 教授, 博士生导师, 主要从事植物细胞生物学研究, E - mail: lizaiyun@mail. hzau. edu. cn

复,经多代繁殖和选择,可形成新物种或新种系^[6,7]。以合成的近缘属种间多倍体为桥梁,与栽培种杂交,可有效地实现基因转移^[8~10]。本研究利用 *B. maurorum* 与甘蓝型油菜的杂种合成异源六倍体,并用甘蓝型油菜连续两次与六倍体回交,应用基因组原位杂交(GISH)分析回交二代的基因组组成及减数分裂,研究异源六倍体的稳定性及 *B. maurorum* 基因组染色体在甘蓝型油菜遗传背景下遗传行为,为 *B. maurorum* 的遗传物质向甘蓝型油菜转移提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 杂交与回交

甘蓝型油菜品种中油 821 (*Brassica napus* L. cv Zhongyou 821) 与芸薹属野生种 *B. maurorum* 的种间正反交杂种^[5] 在含秋水仙碱培养基下染色体加倍得到异源六倍体 AACCM 和 MMAACC。以甘蓝型油菜中油 821 为轮回亲本,与 AACCM 连续回交 2 次,得到回交二代(BC₂)材料。

1.2 染色体加倍

取种间杂种组培苗的芽尖在培养基 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA + 0.1% 秋水仙碱培养 7~12 d,然后转移至新鲜培养基 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA 培养,直至萌发新芽成苗。为确保获得加倍植株,要求至少获得 10 个在不同芽尖上萌发的新苗;每个新萌发幼苗初步认定为成功加倍,并将每个幼苗再快繁出 3~5 株苗,用于大田种植。

1.3 细胞学观察

材料现蕾的时候,取幼嫩子房,0.002 mol/L 浓度的 8-羟基喹啉处理 3 h,然后用卡诺固定液(无水乙醇 3:冰乙酸 1)固定,4℃ 保存。镜检前,在 1 mol/L 浓度的 HCl 60℃ 解离 6~8 min,然后在载玻片上捣碎,卡宝品红染色,显微镜检查染色体数目。

开花初期,取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,然后 4℃ 保存。镜检时,取中等大小花蕾,剥取其中一个花药,在 1 mol/L 浓度的 HCl 60℃ 解离 2~3 min,在载玻片上捣碎,然后卡宝品红染色,显微镜检查减数分裂时期。对确定为终变期和中期 I 的花蕾保存,用于原位杂交分析。

取正开花的雄蕊,放在载玻片上,滴一滴 I₂-KI 溶液,用镊子挤压花药,然后去掉残渣,盖上盖玻片,在显微镜下检查花粉。

1.4 原位杂交分析

参照葛贤宏的方法^[11]对 BC₂ 材料进行原位杂交分析。

2 结果与分析

2.1 异源六倍体的植株形态特征及减数分裂行为

甘蓝型油菜品种中油 821 与 *B. maurorum* 的杂种经秋水仙碱处理后,染色体数目确认为 $2n = 54$ (图 1a)的才可进入试验分析和下一步试验。形态上与三倍体杂种相比较,异源六倍体表现出叶片增厚,茎秆粗壮,花蕾和花瓣变大。雄蕊花药萎缩,无花粉释放,雄性彻底不育。开放授粉下,异源六倍体基本不结角果。大量的人工授予中油 821 花粉,异源六倍体的结角率也仅 0.6%,并且每角果也仅 1~3 粒种子。种子发育 30 d 后,均死亡。种子发育约 20 多天时,须进行幼胚体外培养。对发育的种子解剖发现,发育 20 多天时,幼胚被胚乳包围;发育近 30 d 时,胚乳消失,种子空瘪,心形胚逐渐枯黄而坏死。由正反交杂种合成的异源六倍体 AACCM 和 MMAACC 均表现出相似的不育性,因此在此研究中细胞质对育性并无影响。

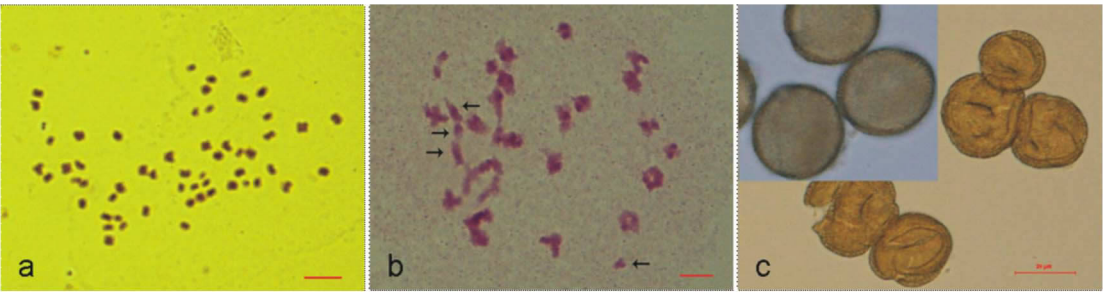
异源六倍体的花粉母细胞减数分裂研究发现,在终变期可形成单价体至六价体,二价体占绝大部分(图 1b)。染色体平均配对构型为 $1.171 + 20.71 \text{ II} + 0.56 \text{ III} + 2.25 \text{ IV} + 0.08 \text{ V} + 0.06 \text{ VI}$ 。在后期 I,有三种染色体分离方式,分别为 27:27,26:28,25:29,其中 27:27 分离方式的细胞占 54.5%。在后期 I 和后期 II,染色体落后和外围散布现象频繁发生。落后和分布在外围的染色体在末期 II 通常形成微核,最后发育成小花粉粒。

从萎缩的花药挤压出的花粉在显微镜下发现,花粉粒表面皱缩,有凹陷的沟痕,而甘蓝型油菜正常的花粉粒则是浑圆、饱满的(图 1c)。

2.2 回交后代植株形态特征

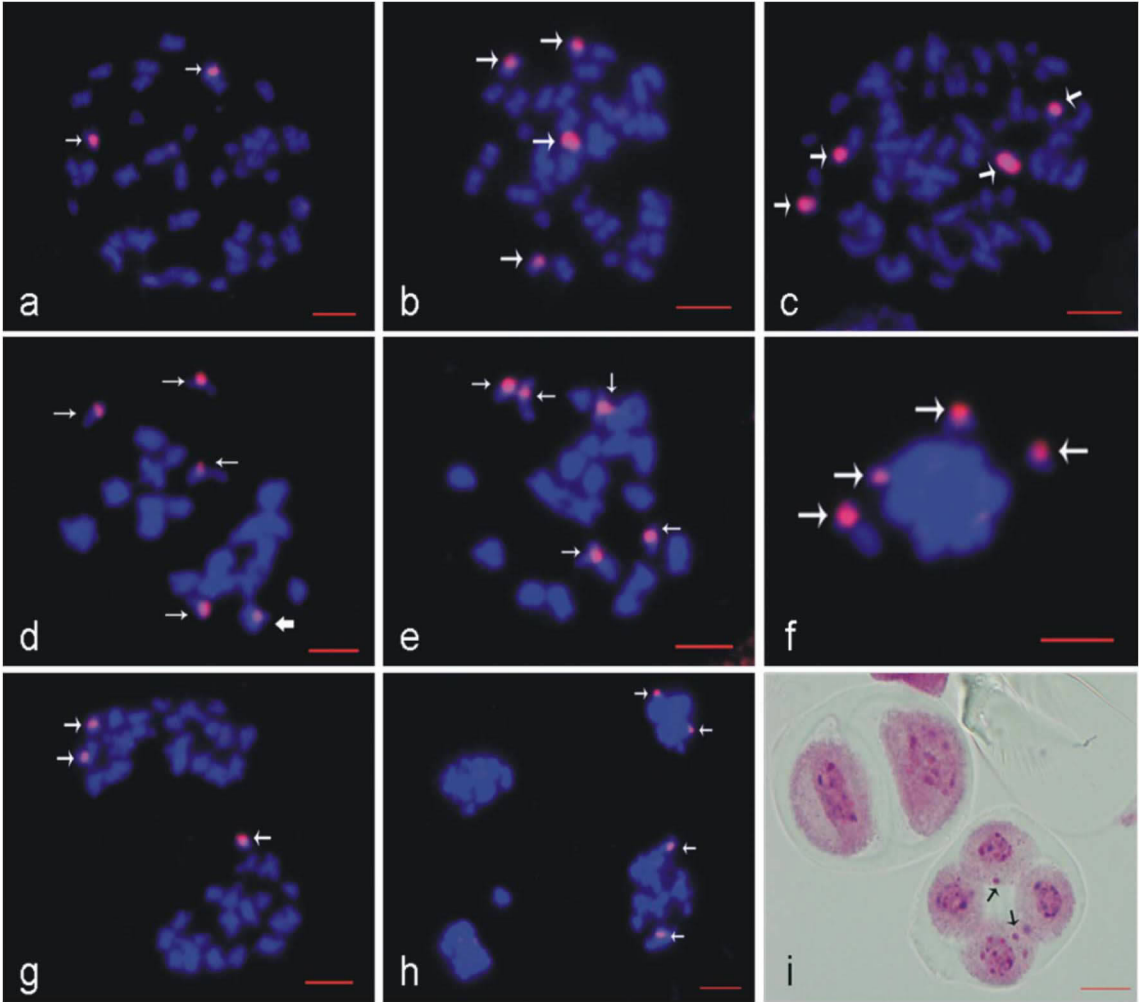
异源六倍体与甘蓝型油菜的回交一代(BC₁)五倍体(AACCM)同样表现出多倍体的形态特征,如叶片肥厚、植株粗壮,但同样表现出高度的雄性不育和较低的雌性可育性。BC₁ 植株用中油 821 花粉授粉后,种子也不能正常发育成熟,生长约 30 d 后坏死;在授粉后 20 d 左右,借助幼胚培养技术才可得到后代。

BC₂ 植株的形态特征接近甘蓝型油菜,不再具有异源六倍体和五倍体的特征,但各植株形态差异明显,表现在叶片颜色、厚度、形状,叶脉清晰,茎秆表面蜡粉的多少等。雄蕊无花粉释放,高度不育;开放授粉,不结角果;回交授以中油 821 花粉,可结少



注:a:六倍体的体细胞 $2n=54$;b:终变期,25II + 4I,单价体箭头标记;
c:甘蓝型油菜花粉(左上角)与六倍体花粉比较;标尺:a,b图,5 μ m;c图,20 μ m
Note:a:one mitotic cell with $2n=54$;b:one diakinesis pollen mother cell (PMC) with 25II + 4I (arrows);
c:pollen comparison between allohexaploid and *B. napus* (up left); Bar:a,b:bar = 5 μ m;c, bar = 20 μ m

图1 芸薹属异源六倍体细胞学观察结果
Fig.1 Cytology of *Brassica* allohexaploids



注:BC₂ 的 GISH 分析,M 染色体被红色信号标记,以小箭头标明。a:2n=41,其中 2 条 M 染色体。b:2n=41,4 条 M 染色体。
c:2n=61,4 条 M 染色体。d:终变期,5 条 M 染色体,其中 4 条呈单价体,1 条与 A/C 染色体配对(大箭头),其它 A/C 呈二价体。
e:终变期,5 条 M 染色体呈单价体,A/C 染色体呈二价体。f:4 条 M 染色体分布在 A/C 染色团外围。g:后期 I,
20: 22 分离,M 染色体两极分别 1、2 条。h:后期 II,两组含 2 条 M 染色体,两组不含;染色体落后。
i:BC₂ 的二分体和四分体;四分体内有染色体丢弃在核外围(箭头)。标尺:i 图,10 μ m;其余为 5 μ m
Note:GISH analysis of BC₂ progenies, M chromosomes were labeled (red signals) and marked with arrows. a:one mitotic cell with
2 M chromosomes ($2n=41$). b:one mitotic cell with 4 M chromosomes ($2n=41$). c:one mitotic cell with 4 M chromosomes ($2n=61$).
d:one diakinesis PMC with 5 M chromosomes, 4 as univalents and one forming a bivalent with A/C chromosome (big arrow).
e:diakinesis PMC with 5 M chromosomes, all as univalents. f:diakinesis PMC with 4 M chromosomes at the periphery. g: anaphase I with 20: 22
chromosome segregation, one and two M chromosomes in each polar. h:anaphase II with four daughter groups plus laggards, in two daughter groups
with two M chromosomes each. i:one dyad and one tetrad with chromosomes excluded from the nuclei (arrows). Bar:i, bar = 10 μ m; others,5 μ m

图2 异源六倍体与中油 821 的 BC₂ 后代染色体形态
Fig.2 Cytology of BC₂ progenies from *Brassica* allohexaploids and *B. napus* cv Zhongyou 821

量角果,结角率约 1%。种子不能正常发育成熟,必须借助幼胚离体培养才可得到后代。授粉后种子发育的解剖结果与六倍体结果相同。在 BC₂ 群体中,一株株比较特殊,花蕾大、叶片肥厚、茎枝粗壮,表现出多倍体特征,经细胞学观察证实,染色体数目为 61 条。

2.3 BC₂ 的细胞学观察结果

利用基因组原位杂交方法,选择 6 株 BC₂ 分析其染色体组成和减数分裂。不同植株间的染色体数目不尽相同,附加的 M 基因组染色体数目也不同(表 1),在 2~5 条之间(图 2a、b、c)。形态上表现出多倍体特征的植株(2n = 61)的染色体组成为 4 条 M 基因组染色体与 57 条油菜染色体(图 2c)。

花粉母细胞减数分裂联会的 GISH 结果表明,

表 1 BC₂ 植株的染色体组成
Table 1 Chromosome composition of BC₂ plants

株号 Plant code	2n	A/C 染色体数 A/C chromosome number	M 染色体数 M chromosome number
1	38	36	2
2	41	37	4
3	41	39	2
4	42	39	3
5	43	38	5
6	61	57	4

3 讨论

利用秋水仙碱处理杂种 F₁ 实现染色体加倍从而合成异源多倍体的方法在芸薹属作物研究上应用广泛^[11~13]。本文将杂种苗在加秋水仙碱的培养基上处理较长时间,获得的异源六倍体无嵌合体。不育的 F₁ 合成异源多倍体后,育性通常有一定程度的恢复^[12~14],但本研究中合成的异源六倍体育性并没有恢复,与 Chrungu 等的结果相似^[2]。过去不少研究表明,减数分裂的异常是影响多倍体育性的主要细胞遗传学因素^[15,16]。本研究花粉母细胞的观察结果也表明,在减数分裂各时期均存在严重异常,如联会配对混乱、染色体落后、后期染色体分离不均等;而异常的减数分裂行为导致了畸形、无活性的花粉粒。种子发育的解剖结果还发现,心形胚不能进入成熟胚时期,把它们转移到培养基上则可发育成苗。说明胚发育后期胚乳不能为胚的成熟提供营养,因而胚乳败育是育性不能恢复的关键原因。相似结果和结论在过去也曾有报道^[17]。

高度不育限制了异源多倍体的直接利用。以栽培种亲本作轮回亲本,与异源多倍体进行多次回交,可实现近缘种的优良基因向栽培种导入。*B. maurorum* 的基因组 M 与芸薹属栽培种基因组 A、C 具有

甘蓝型油菜基因组 A/C 染色体优先进行同源配对,形成同源二价体,附加的 M 基因组染色体多以单价体形式存在(图 2d、e)。个别 M 染色体可与 A/C 染色体发生部分同源配对形成二价体或多价体。在染色体的空间分布上,少量细胞表现出 M 染色体被排斥在 A/C 染色体的外围,如图 2f。在后期 I,染色体多以不均等方式分离,M 染色体也不均等地分配到配子当中(图 2g),其中可产生不含整条 M 染色体的配子(图 2h)。在后期 I/末期 I 阶段,观察到的染色体落后频率较高。在四分体阶段,除了正常的四分孢子外,还观察到二分孢子、三分孢子、五分孢子及更多的小孢子(图 2i)。花粉的显微观察结果发现,花粉粒表面皱缩、不饱满。

较近的亲缘关系,分别最多可形成 3、2 个异源配对二价体^[4]。但在 *B. maurorum* 与甘蓝型油菜的杂种中,M 与 A/C 基因组间发生联会的频率较低,因为 A、C 两个基因组具有高度的同源性,优先进行基因组内及基因组间的配对^[5]。在异源多倍体与甘蓝型油菜的回交二代中,甘蓝型油菜的染色体各自优先与自己的同源染色体进行同源配对;但由于 M 基因组与 A/C 基因组具有一定的同源性,因而观察到 M 与 A/C 染色体组的配对。这些结果表明,M 基因组有可能与 A/C 基因组发生遗传物质交换,推测 BC₁ 可能产生雌配子(n = 42, AACCC + 4M)与甘蓝型油菜雄配子(n = 19, AC)结合形成(AAACCC + 4M)。

通过双二倍体(异源多倍体)回交法可创建异附加系,在芸薹属作物已有相关报道^[9,18,19]。本研究中 BC₂ 花粉母细胞减数分裂的 GISH 结果表明,在后期 II 产生含一条 M 基因组染色体的配子,因而在 BC₃ 中,将出现附加 1 条 M 基因组染色体的甘蓝型油菜附加系。另外,GISH 结果还发现,在后期 II 还产生不含 M 染色体的配子,这些配子的基因组可能与 M 基因组发生过遗传物质交换,与甘蓝型油菜的配子结合将产生新型甘蓝型油菜。Plieske 等用甘蓝型油菜多次与三基因组 ABC 杂种回交,得到的

新型甘蓝型油菜就渗入了 B 基因组的抗性基因^[20]。因而以人工合成的种间多倍体为材料与栽培种杂交,可实现有效的基因转移^[8~10]。

本研究中 BC₂ 各植株附加的 M 染色体不同,数目也有差异,因而形态学上表现出较明显的差异。随着进一步的回交,不同染色体控制的遗传性状也将分离。虽然异源六倍体、BC₁ 及 BC₂ 材料均高度不育,但 BC₃ 植株在田间开放授粉的情况下一部分植株育性恢复,结实率良好,为附加系的培育与鉴定提供了便利。

参考文献:

- [1] Prakash S, Bhat S R, Quiros C F, et al. *Brassica* and its close allies: cytogenetics and evolution [J]. *Plant Breeding Review*, 2009, 31: 21 – 187.
- [2] Chrungu B, Verma N, Mohanty A, et al. Production and characterization of interspecific hybrids between *B. maurorum* and crop *Brassicas* [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98 (3 – 4): 608 – 613.
- [3] Garg H, Banga S, Bansal P, et al. Hybridizing *Brassica rapa* with wild crucifers *Diplotaxis eruroides* and *Brassica maurorum* [J]. *Euphytica*, 2007, 156(3): 417 – 424.
- [4] Yao X C, Du X Z, Ge X H, et al. Intra – and intergenomic chromosome pairings revealed by dual – color GISH in *Brassica* trigenomic hybrids of *Brassica juncea* and *B. carinata* with *B. maurorum* [J]. *Genome*, 2010, 53 (1): 14 – 22.
- [5] Yao X C, Ge X H, Chen J P, et al. Intra – and intergenomic relationships in interspecific hybrids between *Brassica* (*B. rapa*, *B. napus*) and a wild species *B. maurorum* as revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH) [J]. *Euphytica*, 2010, 173(1): 113 – 120.
- [6] Lange W, Toxopeus H, Lubberts J H, et al. The development of raparadish (\times *Brassicoraphanus*, 2n = 38), a new crop in agriculture [J]. *Euphytica*, 1989, 40(1 – 2): 1 – 14.
- [7] 李炳林, 张伯静, 马金虎, 等. 亚比棉人工合成及研究现状 [J]. *植物遗传资源科学*, 2000, 1(3): 56 – 60.
- [8] Laikova L I, Arbuzova V S, Efremova T T, et al. Resistance to fungal diseases in hybrid progeny from crosses between common wheat variety saratovskaya 29 and the amphidiploid *Triticum timopheevii*/*Triticum tauschii* (AAGG-DD) [J]. *Russian J Genetics*, 2004, 40(9): 1 046 – 1 050.
- [9] Wang Y P, Sonntag K, Rudloff E, et al. GISH analysis of disomic *Brassica napus* – *Crambe abyssinica* chromosome addition lines produced by microspore culture from monosomic addition lines [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(1): 35 – 40.
- [10] Trojak – Goluch A, Berbec A. Meiosis and fertility in interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. \times *N. glauca* Grah. and their derivatives [J]. *Plant Breeding*, 2007, 126(2): 201 – 206.
- [11] 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 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [12] Choudhary B R, Joshi P, Singh K. Synthesis, morphology and cytogenetics of *Raphanofortii* (TTRR, 2n = 38): a new amphidiploid of hybrid *Brassica tournefortii* (TT, 2n = 20) \times *Raphanus caudatus* (RR, 2n = 18) [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101(5 – 6): 990 – 999.
- [13] Banga S S, Bhashar P, Ahuja I. Synthesis of intergeneric hybrids and establishment of genomic affinity between *Diplotaxis catholica* and crop *Brassica* species [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(7): 1 244 – 1 247.
- [14] Chandra A, Gupta M L, Ahuja I, et al. Intergeneric hybridization between *Erucastrum cardaminoides* and two diploid crop *Brassica* species [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(8): 1 620 – 1 626.
- [15] Gaonkar R V, Torne S G. Induced autotetraploidy in *Ageratum conyzoides* L. [J]. *Cytologia*, 1991, 56(3): 327 – 331.
- [16] Costa J Y, Forni – Martins E R. A triploid cytotype of *Echinodorus tennellus* [J]. *Aquat Botany*, 2004, 79(4): 325 – 332.
- [17] 徐爱遐, 黄继英, 金平安, 等. 甘蓝型油菜和芥菜型油菜种间杂交研究 [J]. *西北植物学报*, 1999, 19(3): 402 – 407.
- [18] Budahn H, Schrader O, Peterka H. Development of a complete set of disomic rape – radish chromosome – addition lines [J]. *Euphytica*, 2008, 162(1): 117 – 128.
- [19] 吕文欣, 王彦华, 赵建军, 等. 大白菜 – 结球甘蓝 1 号染色体二体附加系的获得与鉴定 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(7): 1 275 – 1 282.
- [20] Plieske J, Struss D, Robbelen G. Inheritance of resistance derived from the B – genome of *Brassica* against *Phoma lingam* in rapeseed and the development of molecular markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97(5 – 6): 929 – 936.

(责任编辑: 郭学兰)