

甘蓝型油菜 Ogu CMS 恢复系 CLR650 细胞学观察

惠荣奎, 曲 亮, 李 莓, 陈卫江
(湖南省作物研究所, 湖南 长沙, 410125)

摘要:采用压片法对 CLR650 的体细胞染色体数目进行了鉴定, 并对其花粉母细胞减数分裂进行了研究。结果表明, CLR650 体细胞染色体数目为 $2n = 38$, 大多数花粉母细胞减数分裂中染色体的行为正常, 在终变期同源染色体配对后可形成 19 个二价体; 在少数花粉母细胞减数分裂中观察到落后染色体、染色体桥等异常行为; 花粉粒育性为 88.4%。

关键词:甘蓝型油菜; 减数分裂; 染色体; Ogu CMS 恢复系

甘蓝型油菜萝卜细胞质雄性不育 (Ogu CMS) 是油菜杂种优势利用理想的不育系统^[1], 该系统不育性稳定, 易于获得全不育群体, 且不受环境因素影响, 杂种后代有明显的优势。利用该不育系统最大的难点是恢复系转育困难, 因其恢复基因仅存于萝卜染色体组中, 需要通过属间杂交等方法进行转育^[2,3]。由于萝卜染色体组中的恢复基因与甘蓝型油菜缺乏同源性, 很难将恢复基因整合到甘蓝型油菜中, 在引入恢复基因时, 往往会受到萝卜基因影响, 伴随一些不良性状, 如结实不良和高硫苷等^[4,5]。因此, 如何将萝卜恢复基因导入到甘蓝型油菜并尽量减少萝卜片断长度, 成为该系统能否应用于育种的关键。目前, 国外通过细胞融合导入恢复基因以及对恢复材料进行辐射处理等方法^[6,7], 已培育出系列的 Ogu CMS 恢复系, 使该不育系统成为欧洲、北美等地油菜杂种优势利用的主要应用类型。近年我国对 Ogu CMS 的应用研究也取得了一些进展, 如李琳、李旭峰等^[8,9]将萝卜变种蓝花子中的恢复基因导入到甘蓝型油菜 Ogu CMS 中, 获得了具有附加染色体的恢复材料。陈卫江等^[10]以萝卜-蓝为恢复基因供体材料, 也将萝卜染色体组中的恢复基因导入到甘蓝型油菜 Ogu CMS, 而且通过自交与回交强化筛选, 获得了自交、测交均为全可育的纯合恢复系 CLR650。为进一步探讨该恢复系的利用前景, 本文对 CLR650 的体细胞染色体数目及花粉母细胞减数分裂染色体行为进行了观察与分析, 以期从细胞学水平研究该恢复材料的遗传特点。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蓝型油菜 Ogu CMS 恢复系 CLR650, 由 Ogu CMS (甘蓝型 $2n = 38$) 与 *Raphanobrassica* (萝卜-蓝, $2n = 58$) 杂交后代中转育, 属于同质恢复系。该恢复系育性表现已经基本稳定, 自交、测交均可获得 100% 的全可育群体。但在其它性状表现方面, 该恢复系仍存在着一些明显不足, 如恢复系自身的自交结实性较差, 杂交 F_2 的遗传分离不符合孟德尔遗传模式, 恢复系中的其它萝卜基因对植株的正常表现还存在着明显影响。该恢复系由湖南省作物研究所提供。

1.2 制片方法

1.2.1 体细胞观察方法 有丝分裂观察, 从植株上选取幼小花序, 放置 0.002 mol/L 8-羟基喹啉在 22°C 下处理 5h, 然后置于乙醇: 冰醋酸 (3: 1) 混合液中固定过夜。参照 Li 等^[11]的方法, 剥出子房, 在 1 mol/L 盐酸 60°C 恒温解离 5~6min, 改良的卡宝品红染色后, 压片并置于显微镜下观察, 选取染色体数目清晰的细胞进行统计, 以 80% 以上细胞的染色体数目为标准, 确定染色体的数目。

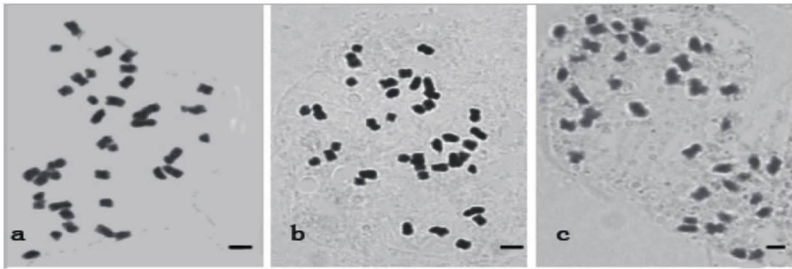
1.2.2 减数分裂及花粉活力观察方法 减数分裂观察, 取花序顶端幼小花蕾, 在卡诺固定液 (乙醇: 冰醋酸 3: 1) 中固定 24h, 用 1 mol/L HCl 60°C 恒温解离 3min, 从花蕾中取出花药, 在载片上解剖出花粉母细胞, 滴 1 滴改良卡宝品红, 压片镜检。花粉育性观察时, 取成熟花药将花粉粒涂于玻片上, 滴 1 滴醋

酸洋红,染色 3min 后,显微镜下观察,染色深、外形圆的计为可育花粉粒,不染色或染色浅,外形皱瘪的计为败育花粉粒,计算出可育花粉粒百分率。

2 结果与分析

2.1 染色体数目观察

CLR650 体细胞染色体数目观察表明,该恢复系的体细胞染色体数目为 $2n = 38$ 到 $2n = 40$ 之间(图 1),其中以染色体 $2n = 38$ 的细胞为主。本研究



注:a: $2n = 38$, b: $2n = 39$, c: $2n = 40$, Bar: $2\mu\text{m}$

图 1 CLR650 不同染色体数目的细胞

表 1 CLR650 的染色体数目及频率

染色体数目	观察细胞总数	细胞类型数	比率/%
38	56	47	83.93
39	56	2	3.57
40	56	7	12.5

2.2 花粉母细胞减数分裂过程观察

观察 CLR650 花粉母细胞减数分裂过程,发现在前期 I 的粗线期,部分染色体出现明显染色深的染色粒(图 2-a),多数细胞终变期能够形成 19 个二价体,而且二价体高度浓缩,形态清晰,分散度好(图 2-b,图 2-c),利于染色体计数。19 个二价体的形成,进一步佐证了其染色体数目为 $2n = 38$ 。进入中期 I,发现二价体能够聚集并排列到赤道面上(图 2-d),至后期 I,配对的同源染色体可正常彼此分离,并向细胞的两极运动(图 2-e)。在末期 I,观察到染色体解螺旋,并在细胞两极分别形成新的子核,但细胞质不分裂(图 2-f)。中期 II,两个子细胞中的染色体均能排列到细胞的赤道面(图 2-g);后期 II,每条染色体上的两个姐妹染色单体能够分开,并分别走向细胞一极,在细胞内可清楚地看到四组染色体(图 2-h)。末期 II,在细胞内形成了四个子核并最终发育成花粉粒(图 2-i,图 2-j)。统计正常的花粉粒形成的数量,约为 88.4%。这一结果表明,CLR650 在大多数情况下能够正常完成减数分裂全过程,进而形成正常的可育花粉。

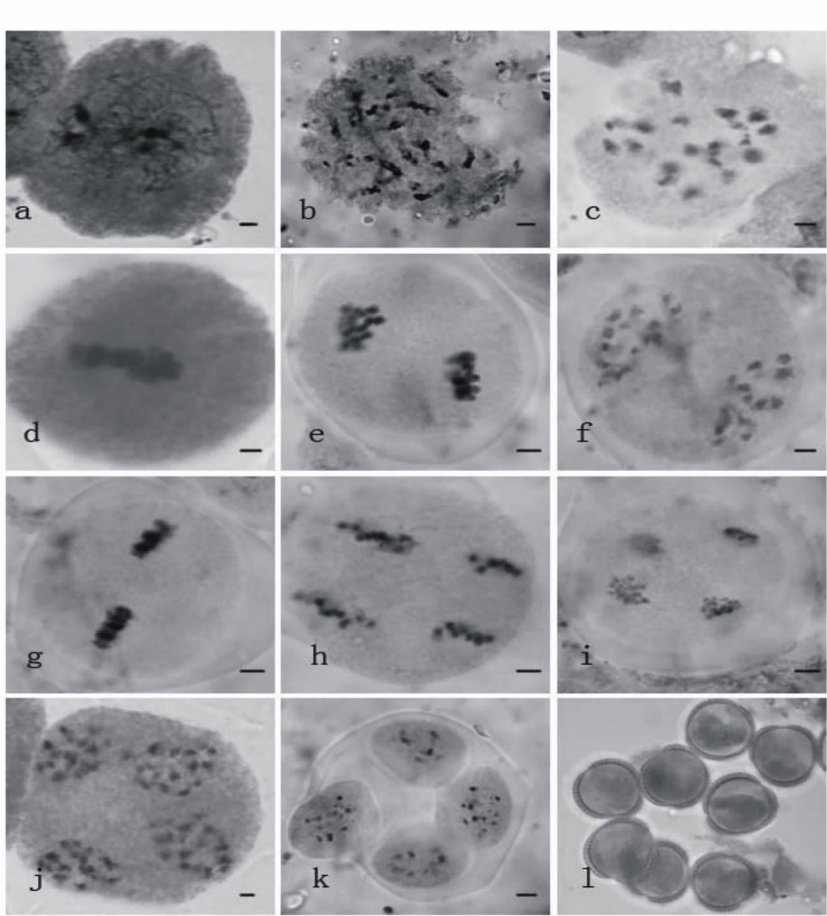
在 56 个能够清楚进行染色体计数的细胞中,共观察到 $2n = 38$ 的细胞 47 个,占细胞观察总数的 83.93%, $2n = 39$ 的细胞 2 个,占细胞观察总数的 3.57%, $2n = 40$ 的细胞 7 个,占细胞观察总数的 12.5%(表 1),可以确认其染色体数目为 $2n = 38$ 。这一观测结果排除了该恢复系存在萝卜染色体附加系的可能性,表明由远缘杂交后代筛选的恢复系 CLR650 的染色体结构已基本稳定,源于萝卜染色体组的 Ogu CMS 恢复基因已整合到甘蓝型染色体中。

2.3 花粉母细胞减数分裂染色体行为异常现象观察

由于外源萝卜基因的影响,CLR650 花粉母细胞的减数分裂过程也存在着较高频率的染色体异常行为,主要表现为落后染色体、染色体桥及染色体两极分布不均衡等异常现象。如在第一次分裂中,终变期可观察到未配对的单价体及形成“8 字环”的多价体(图 3-a);中期 I 可观察到部分落后染色单体和提前分离;后期 I 可观察到大量的落后染色体和染色体桥等。由此可造成有些细胞出现染色体为 20: 20 或 19: 20 的异常分离,并导致一定频率的胞质分裂不均及核穿壁(图 3-e),统计第一次分裂的异常频率,各分裂过程的异常行为约为 30%(表 2)。有意思的是,进入到第二次分裂,细胞分裂的异常行为呈明显下降趋势,虽然在中期 II 也可观察到部分染色单体落后和提前分离(图 3-f),染色体呈三组多极分裂(图 3-g),以及后期 II、末期 II 的染色体落后和染色体桥(图 3-h,图 3-i)等现象,其表现为异常细胞仅占观察总数的 15% 左右(表 2),而且在四分体时期大多数细胞均可形成正常四分体(89.15%),只有少数的五分体细胞不能完成最终发育,成为败育花粉。该结果说明,CLR650 在减数分裂过程中出现的异常表现主要发生在第一次分裂过程中,而且分裂异常对花粉的最终形成似乎并未造成太大的影响。

表 2 CLR650 减数分裂异常现象统计

时期	细胞总数	异常细胞数(比例)	异常类型	细胞数
终变期	263	79(30.03%)	染色体异常联会	79
中期 I	224	89(39.73%)	染色体提前分离	24
			染色体落后	65
后期 I	263	77(29.28%)	染色体落后	45
			染色体桥	26
			核穿壁	6
末期 I	96	32(33.33%)	微核	32
前期 II	18	2(11.11%)	微核	2
中期 II	64	13(20.31%)	染色体落后	13
后期 II	152	26(17.11%)	染色体落后	8
			染色体桥	18
末期 II	324	55(16.98%)	染色体落后	34
			微核	
四分体时期	129	14(10.85%)	微核	11
			多分体	3



注:a.粗线期;b-c.终变期 19 个二价体;d.中期 I;e.后期 I;f.末期 I;g.中期 II;h.后期 II;i-j.末期 II;k.四分体;l.花粉粒。Bar = 2 μm

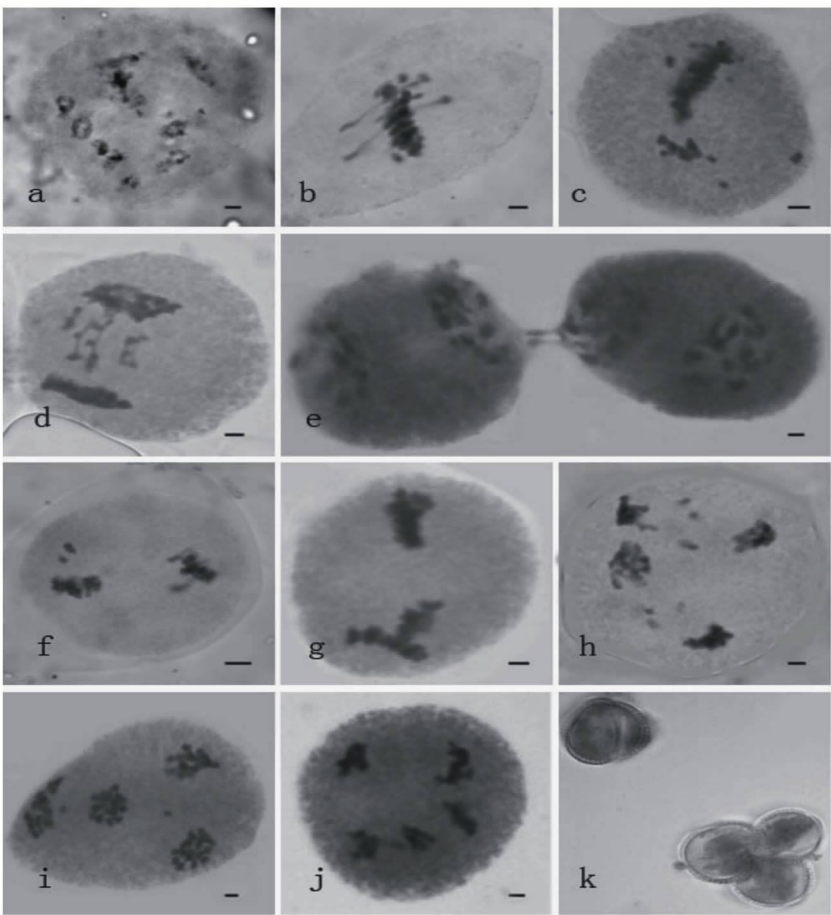
图 2 CLR650 花粉母细胞减数分裂观察

3 结论与讨论

利用远缘杂交扩大遗传背景,进而获得新型种质资源是现代农作物育种的重要途径之一^[12]。但是,源于远缘杂交的后代材料,多因其遗传差异大,附加染色体不易清除等原因,分离世代长,难以获得稳定后代。在染色体水平上,主要呈现为联会异常等现象,严重时会产生雌性不育或雄性不育,造成远

缘杂交应用上的障碍^[13]。

本研究材料 CLR650,源于甘蓝型油菜与萝-蓝杂交后代,该材料的创新之处是已将萝-蓝中的 Ogu CMS 恢复基因导入到甘蓝型油菜中,而且通过长达 17 年的选择与筛选,其主要生物学性状已经稳定,恢复基因也已达纯合状态^[10]。但研究中发现,该恢复材料仍然存在自交结实力差,杂交后代育性分离异常,以及转育新的纯合恢复材料异常困难



注:a. 终变期;b - c. 中期 I;d. 后期 I;e. 末期 I;f - g. 中期 II;h. 后期 II;i - j. 末期 II;k. 花粉粒. Bar = 2 μm

图3 CLR650 花粉母细胞减数分裂异常现象观察

等现象,与国外同类研究结果相似,并推测该现象产生的原因主要是与恢复基因相连的萝卜片断有关^[14,15]。

本研究发现,虽然部分细胞存在 $2n = 39$ 和 $2n = 40$ 的染色体类型,但 $2n = 38$ 的细胞类型达到 83%,而且在花粉母细胞减数分裂中,也观察到大量的 $n = 19$ 的二价体,可以进一步作为 $2n = 38$ 的佐证。细胞学验证 CLR650 的体细胞染色体数为 $2n = 38$,对于 Ogu CMS 恢复系的筛选有着重要意义,表明源于萝卜染色体 Ogu CMS 恢复基因已经导入到甘蓝型染色体组,为新型恢复材料的转育奠定了良好的基础。值得注意的是,在染色体数目多于 38 的细胞中,往往观察到类似于染色体断片或 B 染色体等形态较小的染色体,这种现象在 CLR650 的早期世代更为明显。至于多出的染色体来源以及其对细胞分裂所造成影响尚不清楚,有待于进一步深入研究。

对 CLR650 花粉母细胞减数分裂的观察表明,在大多数情况下,CLR650 花粉母细胞可通过减数分裂形成四分体并发育为正常花粉粒。本研究观察

到的可育花粉数占观察总数的 88.4%,表明 CLR650 的花粉发育基本达到正常,至少不会对传粉受精造成太大的影响。大田中以 CLR650 的花粉与其它甘蓝型油菜杂交,杂交当代均可正常结实也充分证明这一点。但是,在 CLR650 的减数分裂过程中,各时期存在着较高频率的染色体行为异常,如染色体落后、染色体桥、染色体分离不均等,甚至还出现核穿壁等异常现象,最终约有 11% 的败育花粉,分析其原因,在大多数有性生殖生物中,减数分裂会通过同源染色体间的配对、联会、交换、分离等完成其遗传过程,而远缘杂交后代由于来自双亲的异源染色体不能正常联会而形成单价体、多价体等异常现象,相似结果和结论在过去也曾有较多报道^[16,17]。本研究观察到 CLR650 减数分裂终变期二价体存在环状及十字状构型等现象,表明同源染色体间存在着联会、重组的发生,但是观察中发现部分细胞有着“8”字形、“0”形等多价体的出现,又表明由于外源基因的导入,会使染色体的联会存在一定程度的紊乱,从而导致减数分裂不均,出现三分、五分的小孢子现象。

众多研究表明,减数分裂异常是影响育性的主要细胞遗传学因素^[18,19],对 CLR650 而言,外源的萝卜基因与油菜染色体组间的遗传差异可能是导致细胞减数分裂异常的主要原因,这一结果间接地解释了 CLR650 的遗传分离异常现象。对 CLR650 的有效应用,有待于进一步减少外源遗传物质,即尽可能减少恢复基因携带的其它萝卜基因。

参考文献:

- [1] 祝朋芳,魏毓棠. Ogura 胞质芸薹属作物雄性不育系的应用现状及前景[J]. 长江蔬菜,2004(4):44-46.
- [2] 刘后利. 油菜的遗传和育种[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985. 387-391.
- [3] Yamagishi H. Distribution and allelism of restorer genes for Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes[J]. Genes & Genetic Systems, 1998,73(2):79-83.
- [4] Pelletier G, Primard C, Vedel F, et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion[J]. Molecular and General Genetics, 1983,191(2):244-250.
- [5] Bartkowiak - Broda I, Poplawska W. Characteristics of double low winter rapeseed lines with introduced restorer gene for CMS Ogura[C]. Canberra: Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, 1999. 172.
- [6] Pruvot J C, Raling K K, Charne D, et al. Development of low glucosinolate restore and Ogura CMS winter rape hybrid[C]. Canberra: Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, 1999, 270-273.
- [7] Primard - Brisset C, Poupard J P, Horvais R, et al. A new recombined double low restorer line for the Ogu - INRA - CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(4):736-746.
- [8] 李琳,李旭锋,李红梅,等. 油菜萝卜细胞质雄性不育系恢复材料 Ad-6(F_5)的细胞遗传学研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1997, 34(6):843-846.
- [9] 李旭锋,李琳,秦金红,等. 油菜萝卜质不育系测交后代恢复材料 F_2 (TC_1) 的选育及细胞遗传学研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(1):108-110.
- [10] 陈卫江,李莓,王同华,等. 甘蓝型油菜萝卜细胞质雄性不育恢复材料的创制[J]. 中国农业科学, 2013, 14(1):18-25.
- [11] Li Z, Liu H L, Luo P. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91:131-136.
- [12] 孟金陵. 植物生殖遗传学[M]. 北京:科学出版社, 1995.
- [13] 刘忠松,官春云. 油菜远缘杂交育种的主要障碍及其克服方法[J]. 作物研究, 1995(4):1-7.
- [14] Pellán - Delourme R, Renard M. Cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.): Female fertility of restored rapeseed with "Ogura" and cybrids cytoplasm [J]. Genome, 1988, 30:234-238.
- [15] Delourme R, Bouchereau A, Hubert N, et al. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the Ogura radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88(6-7):741-748.
- [16] 伍晓明,许鲲,王汉中,等. 甘蓝型油菜与新疆野生油菜属间杂种的获得与分子鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(4):5-9.
- [17] 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.
- [18] Costa J Y, Forni - Martins E R. A triploid cytotype of *Echinodorus tennellus* [J]. Aquatic Botany, 2004, 79:325-332.
- [19] 姚行成,葛贤宏,李再云. 甘蓝型油菜与 *Brassica maurorum* 的异源六倍体后代及 BC_2 细胞学分析[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(1):16-20.