

人工合成甘蓝型油菜研究进展

富 贵¹, 赵志刚^{2,3*}, 邓昌蓉^{2,3}

(1. 青海民族大学 生态环境与资源学院, 中国青海 西宁 810007; 2. 青海大学 农林科学院, 中国青海 西宁 810016;
3. 青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室, 中国青海 西宁 810016)

摘 要: 利用二倍体亲本甘蓝(*Brassica oleracea*, $2n=18$, CC)和白菜型油菜(*Brassica rapa*, $2n=20$, AA)或白菜(*Brassica campestris*, $2n=20$, AA)可人工获得甘蓝型油菜。新型甘蓝型油菜不仅拓宽了甘蓝型油菜种质资源, 开辟了甘蓝型油菜育种新途径, 而且在芸薹属异源多倍化过程研究中具有广泛的应用。本文重点对人工合成甘蓝型油菜获得方法及后代二倍化过程中染色体、基因组、基因表达和表观遗传学方面所发生的变异及其遗传规律的最新研究进展做概述, 并对近年来人工合成甘蓝型油菜在育种中的一些应用进行综述, 旨在为进一步开展人工合成甘蓝型油菜的研究提供理论依据和新的方向。

关键词: 人工合成甘蓝型油菜; 细胞遗传学; 甲基化; 遗传变异

中图分类号: Q37, S565.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)03-0251-08

Research Progresses of the Synthesized *Brassica napus*

FU Gui¹, ZHAO Zhi-gang^{2,3*}, DENG Chang-rong^{2,3}

(1. The College of Ecological Environmental and Resources, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, Qinghai, China;
2. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China; 3. Key Laboratory of Qinghai Province for Innovation and Utilization of Plateau Crop Germplasm, Xining 810016, Qinghai, China)

Abstract: Synthesized *Brassica napus* can be obtained through *Brassica oleracea* ($2n=18$, CC) and *Brassica rapa* ($2n=20$, AA) or *Brassica campestris* ($2n=20$, AA). Synthesized *Brassica napus* not only makes *Brassica napus* germplasm abundant and develops new approach for *Brassica napus*, but also is widely used in research of the synthesized allopolyploidization process. Herein, an overview of the synthetic methods, the variation and inheritance rules linked to chromosome, genome, gene expression and epigenetics in the diploidization process of synthesized *Brassica napus* was reported. The recent applications of synthesized *Brassica napus* in breeding were also summarized. The review may provide references for the research of synthesized *Brassica napus*.

Key words: synthesized *Brassica napus*; cytogenetics; methylation; genetic variation

(*Life Science Research*, 2018, 22(3): 251~258)

芸薹属(*Brassica*)植物包含了许多经济上有重要价值的作物, 是十字花科(Brassicaceae)植物中最为重要的属。油菜为芸薹属作物, 因其籽可作为食用油原料而被广泛种植。中国是油菜种植面积最广且产量最高的国家, 近几年来农民种植油菜面积不断扩大。油菜种植不仅可满足自家食用

油的需求, 而且通过出售油菜籽可增加收入, 所以对于油菜产量提高和品质改良的研究需不断加强^[1,2]。目前油菜栽培种主要有以下 3 种, 甘蓝型油菜(*Brassica napus*)、白菜型油菜(*Brassica rapa*)和芥菜型油菜(*Brassica juncea*)。甘蓝型油菜起源于欧洲, 其产量和品质与其他两个栽培种相比具明

收稿日期: 2017-10-26; 修回日期: 2018-02-22

基金项目: 青海省春油菜遗传改良重点实验室项目(2017-ZJ-Y09)

作者简介: 富贵(1987-), 男, 甘肃天水人, 硕士, 主要从事分子植物学研究, E-mail: qhmdfg@163.com; * 通讯作者: 赵志刚(1978-), 男, 内蒙古多伦县人, 博士, 青海大学农林科学院研究员, 主要从事春油菜遗传育种研究, E-mail: 13897474887@163.com。

显的优势,而且其具有高抗病、抗逆、适应性广等特征,因此被认为是具有最大利用潜质的油料作物之一,是中国栽培面积最广的油菜类型^[9]。栽培时间较短、种质资源少、遗传基础狭窄等因素影响了中国甘蓝型油菜的育种进展^[4]。如何增加甘蓝型油菜种质资源,丰富甘蓝型油菜遗传多样性,成为国内育种专家急于解决的问题之一。“禹式三角”理论,结合现阶段分子生物学和细胞遗传学研究结果表明,甘蓝型油菜($2n=38$, AACC)双亲为甘蓝(*B. oleracea*, $2n=18$, CC)和白菜型油菜(*B. rapa*, $2n=20$, AA),两个二倍体亲本经过多次天然杂交,再经染色体自然加倍逐步进化,形成一个新的双二倍体复合种^[5]。其二倍体亲本种白菜和甘蓝栽培起源较早,栽种历史久远,在不同国家有多个亚种和变种,遗传多样性丰富,而且其产量性状和品质性状变异广,因此可利用现有甘蓝和白菜型油菜优良品种杂交,人工合成异源四倍体甘蓝型油菜,从而为拓宽现有甘蓝型油菜遗传基础开辟一条新途径。人工合成异源多倍体早期世代基因组结构及表型变异丰富,遗传不稳定^[6-9],可利用 A-C 基因组进化过程中产生的丰富变异,筛选出新的优良基因,使甘蓝型油菜遗传多样性匮乏这一问题得到有效解决。另外,芸薹属 A-C 基因组间的进化机制及 A-C 基因组形成异源多倍体过程中的遗传变异是十字花科研究的热点问题,人工合成甘蓝型油菜作为一种模式生物已被广泛使用。结合国内外研究进展,本文对人工合成甘蓝型油菜获得方法、后代基因组水平和表达水平遗传变异及在育种中的应用进行综述。

1 人工获得甘蓝型油菜方法的研究

1935年日本学者 Nagahara^[10]提出,二倍体的白菜型油菜与甘蓝天然杂交自然加倍后形成了现在的甘蓝型油菜。基于此理论,很多学者展开了人工杂交获得甘蓝型油菜方法的探索和研究,但是白菜型油菜和甘蓝基因组结构上存在本质差异,属于芸薹属不同栽培种,亲缘关系较远,单纯依靠有性杂交很难成功获得预期杂种^[2]。Nagahara^[10]研究了芸薹属种间白菜型油菜与甘蓝正反杂交后获得杂种的差异,经统计,以白菜型油菜为母本的正交 73 朵花中仅有 4 株获得杂种,而 380 朵反交的花均未得到杂种。Olsson, Nishiyama 等^[11, 12]对甘蓝×白菜型油菜杂交展开的研究中也均未获得杂种。不同种杂交,其亲和性主要是由基因型和

亲缘关系决定的,而且受到亲本的基因组、正反交方向及杂种培育的环境条件等诸多因素影响^[13]。有学者提出十字花科属间和种间杂交不成功的原因主要是杂交种胚发育过程中胚乳凋亡导致胚发育不平衡^[14]。人们通过不断探索和优化人工合成甘蓝型油菜的方法最后发现,通过子房和胚珠体外培养可以极大地提高种间杂种的获得概率,尤其是甘蓝×白菜的杂交组合,其中用胚珠培养的方法更为有效^[15, 16]。早在 1959 年, Nishi 等^[17]就首次将胚抢救方法在人工合成甘蓝型油菜上成功应用。此后许多学者使用胚抢救、胚珠培养和子房培养等组培技术获得了大量的甘蓝型油菜人工合成种^[18-20]。近几年来,植物组织培养技术不断发展,油菜大部分种属内杂交都已实现,人工合成甘蓝型油菜种质资源不断被获得^[21-24]。另外,原生质体融合技术可有效避开有性生殖过程中的生殖隔离,极大地提高了远缘杂交的成功率,有利于促进不同物种胞质间基因整合与重组,这种方法在研究芸薹属不同基因组间进化关系时也有应用^[25, 26]。有学者利用原生质体融合的方法成功获得了人工合成甘蓝型油菜,如 Röbbelen^[27]利用原生质体融合技术获得了白菜型油菜与甘蓝的种间杂种,并利用该人工合成甘蓝型油菜研究了甘蓝型油菜的自然进化过程。

2 人工合成甘蓝型油菜的细胞遗传学研究

2.1 人工合成甘蓝型油菜花粉母细胞减数分裂异常

远缘杂交后代因为受到亲本基因组异质性的冲击,染色体在联会的过程中会出现重排、丢失、消除等异常现象,通过对这些异常染色体观察和研究可揭示不同基因组间染色体同源性来源和发生机制。大量研究发现,人工合成甘蓝型油菜花粉母细胞减数分裂的不同时期均有染色体异常的变化,其染色体配对并不是完全二倍体化,而是存在许多单价体和多价体。Heneen 等^[28]在人工合成甘蓝型油菜后代花粉母细胞减数分裂观察过程中发现,一些细胞的染色体出现了六价体。张颖等^[29, 30]对人工合成甘蓝型油菜花粉母细胞减数分裂进行观察发现,花粉母细胞减数分裂不同时期均出现了个别染色体异常现象,且分裂最后染色体配对模式较为复杂。李俊等^[31]也对人工合成芸薹四倍体(AACC)花粉母细胞减数分裂时的染色体行为进行了研究,结果发现:染色体在双联期

可聚合形成两个具不同特征的染色体群;随后个别二价体逐渐出现,终变期大部分细胞形成了19个二价体,但是也有个别细胞产生了四价体和二价体染色体异常配对。Ohmido等^[32]结合表型性状分析了人工合成甘蓝型油菜后代染色体变异,研究发现表型异常的植株花粉育性较差,染色体数目和结构都表现出不稳定性,有不完整的染色体片段出现。以上对人工合成甘蓝型油菜细胞遗传学的研究表明,A-C两套不同基因组染色体可以部分配对形成多价体,说明两套不同染色体之间具有一定的同源性或存在某种亲缘关系,染色体异常配对或结构变异对于人工合成甘蓝型油菜多倍化的稳定是不可或缺的。

2.2 人工合成甘蓝型油菜花粉母细胞减数分裂异常的原因

早期细胞学研究主要通过染色体压片进行,大量研究表明,芸薹属A-C基因组之间存在同源区域,可以进行染色体配对。Röbbelen^[33]研究芸薹属细胞染色体有丝分裂时发现,基因组A、B和C二倍体可能是由同一个染色体基数为6的共同祖先进化而来。芸薹属3个不同基因组中具有相似的DNA区域,而且这些相似区域在A、B、C3个基因组的组织和分布上有一定的差异^[34-38]。随着生物技术和研究方法的改进,如荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)、原生质体融合、分子标记、基因芯片及高通量基因组测序等技术的应用,对于芸薹属A、B、C3个基因组的亲缘关系有了进一步的研究,以人工合成的二倍体及四倍体为材料的研究表明,相比较A-C间染色体组更多的部分同源染色体配对,A-B、C-B间的非同源染色体配对发生的频率极低^[39],该结论与早期一些研究和推测^[40,41]一致。A-C基因组之间的部分同源性是引起人工合成甘蓝型油菜染色体异常配对的主要原因,这一结论被大量研究所证实。李俊等^[31]认为甘蓝型油菜的染色体在长期进化过程中所产生的结构变异可能主要是A、C基因组加倍过程中内部染色体间交换的结果。Prakash等^[42]研究发现,进化过程中不同组染色体之间的交换会积累,这种不断积累的交换最终导致染色体组结构出现变异,从而使芸薹属种间染色体联会出现混乱。Jenczewski等^[43]以几种不同品种植种的甘蓝型油菜单倍体为研究对象,对其染色体联会行为进行了观察,研究结果表明,甘蓝型油菜染色体配对模式由特定基因决定,C基因

组上有一个与小麦 $ph1$ 相似的主效基因,定名为 $prBn$ 基因。虽然该基因可以有效抑制A-C基因组间具有同源区域的染色体相互配对,但这一发现只在甘蓝型油菜单倍体中得到证实。此外,近期研究发现:人工合成甘蓝型油菜早期世代的染色体非整倍性,染色体重排及剂量补偿效应对人工合成种染色体数目的稳定起到了加强作用^[44]。

3 人工合成甘蓝型油菜的分子生物学研究

异源多倍体进化过程存在一个广泛、迅速的二倍化时期,新生的异源多倍体在其稳定过程中都要经历基因组和表观遗传学上快速变异过程。基因组水平变异主要表现为亲本DNA序列片段消失或新片段出现,变异的发生可能是不同染色体组同源片段不等交换引起基因重组的结果^[5]。甲基化变异引起的基因沉默和激活是表达水平变异的主要方式^[45-47]。高通量测序技术迅速发展,使得小分子RNA (small RNAs, sRNAs)的变异研究在人工合成甘蓝型油菜中相继开展,虽然研究尚处在初级阶段,但也为人工合成甘蓝型油菜的遗传变异研究提供了新思路。自然界中很多异源多倍体的亲本已消亡,但人工合成甘蓝型油菜双亲基因组结构和组成是可分析的,所以其是研究异源多倍化基因组水平遗传和表观遗传变异的理想材料,通过与亲本比较,可对多倍体合成种基因组和基因表达水平产生的变异进行分析,探索其变异发生的来源和机理^[2]。

3.1 人工合成甘蓝型油菜基因组遗传变异

大量研究表明,人工合成甘蓝型油菜早期世代遗传不稳定,不论是表型还是基因组水平都会发生变异,且基因组变异具有一定的偏向性。Song等^[48]利用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分子标记方法,对芸薹属3个基本种相互正反杂交获得的人工合成四倍体甘蓝型油菜(AACC、CCAA)和芥菜型油菜(AABB、BBAA)进行了分析研究,跟踪分析了两种不同类型四倍体自交后代基因组遗传变异现象,发现从自交第2代至第5代的过程中,两个不同基因组类型的四倍体都发生了多种类型的变异,包括亲本DNA片段的丢失、新增片段的出现等。Parkin等^[49]利用RFLP分子标记技术,在人工合成甘蓝型油菜中也发现了亲本基因组序列类似的变异,在人工合成种中筛选出399个多态性序列,但是有159个多态性序列无法在其二倍体亲本中

找到。Lukens 和 Gaeta 等^[50, 51]通过分子标记技术检测了 50 个不同的人工甘蓝型油菜 S_0 代株系, 发现 S_0 代基因组水平发生的变异很少, 但是在 S_0 自交得到的 50 个 S_5 植株中有 47 个植株基因组序列出现了变异位点, RFLP 和简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记分析分别检测到 33.00%和 71.00%的变异位点, 究其变异的原因可能是非同源染色体之间的单向易位导致其大多数片段缺失。富贵^[2]利用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)分子标记技术对以青海大黄油菜为母本、中花芥蓝和中迟芥蓝为父本的人工合成种 S_0 和 S_1 世代植株展开研究发现, S_0 世代发生变异的扩增条带占 S_0 总条带的 1.71%, S_1 为 0.915%。Song 等^[34]利用 RFLP 分子标记技术对人工合成甘蓝型油菜自交后代中染色体结构上发生的改变进行了观察, 结果显示, 合成种自交到第 2 代至第 5 代, 都会出现一些在亲本中无法找到的 RFLP 多态性位点, 而且这种新型变异带型的出现和细胞质核互作有关系, 推测人工合成种合成初期, 基因组受到异质性冲击导致其结构已经产生了变化。另外, 人工合成异源多倍体进化过程中, 遗传变异发生频率有一个递增的趋势, 究其原因, 多倍化过程中染色体配对时, 具有部分同源区段的两套亲本染色体会发生交换, 而这种错配的紊乱引起了染色体结构和序列的改变, 导致其在遗传过程中子代染色体错配发生的概率进一步增加, 从而引发后代出现包括染色体消除与补偿、部分同源染色体重排、序列新增和缺失等更高频率的变异。前人将这种遗传变异随着世代的增高而递增的现象称为“多倍化齿轮效应”^[52]。

3.2 甲基化及基因表达变异

甲基化是对 DNA 序列 5'-CCGG 位点进行修饰的一种表观遗传学调控方式, 它在整个植物生长发育过程中具有很重要的调控作用。植物基因组甲基化研究发现, 转座子和反向转座子序列是 DNA 甲基化的主要位点, 甲基化修饰通常表现为特定基因的表达和沉默^[2]。前人对芸薹属中基因组 DNA 转座子附近的甲基化模式进行了研究, 对发生甲基化的序列展开了分析, 发现超甲基化和去甲基化是甲基化改变的两种模式, 而且甲基化变异是可遗传的, 人工合成甘蓝型油菜二倍化过程中, 其后代甲基化也会表现出一定规律的变异^[53]。相关研究对 50 个甘蓝型油菜人工合

成株系基因组甲基化变异进行了检测分析, 发现人工合成种 S_0 代 DNA 上胞嘧啶甲基化变异频繁, 而且以甲基化为主, 甲基化变异主要发生在 A 基因组上。研究还发现, 人工合成种第 1 代发生的甲基化变异会在第 5 代固定下来, 虽然随着自交代数增加基因组水平变异发生频率较高, 但是甲基化水平变异趋于稳定^[50, 51]。富贵^[2]利用甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)分子标记技术, 对大黄油菜×中迟芥蓝人工合成种 S_0 世代植株进行了甲基化分析, 发现 S_0 植株中只有 3 个位点变异, 进一步与亲本比较发现, 变异位点全部发生在母本基因组上, 这和 Lukens^[50]的研究结果相似。刘红磊^[54]对羽衣甘蓝和白菜型油菜杂交后代 S_0 至 S_3 世代转座子侧翼 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化进行了 MSAP 检测, 从二倍体亲本到异源四倍体人工合成甘蓝型油菜转座子附近 CCGG 位点发生了广泛的甲基化变异, 且这种变异有一定的规律性。Ran 等^[55]利用 MSAP 和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)技术分析了甘蓝型油菜多倍化过程中 DNA 甲基化水平的动态变化。研究发现: F_1 的甲基化水平最低, 为 38.7%, 而 S_1 ~ S_3 世代的甲基化水平逐渐升高, 最高达 40.32%, 与此同时, DNA 甲基转移酶 MET (methyltransferase)和 CMT (chromomethylase)的表达也出现了同样的变化趋势。近期研究发现, 植物基因组在基因表达和转座子沉默之间存在一种权衡关系, 通过甲基化沉默转座子通常会抑制其下游基因的表达^[56-58]。

人工合成甘蓝型油菜基因组不仅会发生有规律的变异, 而且其后代在基因表达上也会产生一定变化。cDNA-AFLP 技术被广泛用于分析异源多倍体转录水平的变异研究。Xu 等^[53]以人工合成的甘蓝型油菜不同生长期的叶片为材料, 利用 cDNA-AFLP 分子标记技术进行了检测, 结果发现: 人工合成种 F04J2 有 4.09%的条带不同于亲本扩增带型; 不同组织器官基因表达差异不明显, 表达变异趋于发生在 C 基因组上, C 基因组上发生的基因沉默变异比例(8.83%)高于 A 基因组(3.96%)。陈新^[59]应用 cDNA-AFLP 分子标记技术对新合成的甘蓝型油菜及其亲本苗期全基因组的基因表达谱进行分析发现, 表达谱发生了比较广泛的变异, 与双亲本比较, 人工合成种中存在基因激活和沉默的变异, 其中激活和沉默的基因各

占被检测基因的 17.0%和 29.6%。邓昌蓉等^[5]以人工合成甘蓝型油菜亲本、S₀代、S₃代植株为材料,用 26 对引物进行扩增,结果表明, S₃世代在基因组水平发生变异的扩增条带仅占总扩增条带的 6.33%,但是表达水平变异为 81.34%,而且变异都倾向于发生在 C 基因组上。由此说明 A-C 基因组多倍化后基因表达水平存在一定程度的变异,变异大小及发生的偏向性因研究背景不同表现出差异性。另外,有研究表明,表达水平产生变异大小和基因组变异具有相关性,如 Gaeta 等^[51]研究发现,新型甘蓝型油菜 S₀代基因组水平的变异和基因表达水平的变异没有关系,但是对自交第 5 代植株基因组和表达水平变异分析发现,二者具有显著的相关性($r^2=0.55, P<0.000 1$)。近年来随着 RNA-Seq 技术的发展和成熟,人工合成甘蓝型油菜表达水平的变异进一步被证实。植物基因组多倍化过程中伴随有基因表达的变化,这种变化模式包括多倍化后相比较亲本基因表达的上调、表达变异倾向性和部分同源偏向表达等现象^[58]。Jiang 等^[60]对人工合成甘蓝型油菜 F₁~F₄代及其亲本转录组的研究表明,多倍体后代中基因表达并非亲本基因组的简单叠加,而是存在大量的非加性表达。张大为^[58]通过比较人工合成甘蓝型油菜部分同源基因在亲本和后代中的表达情况,发现亲本中的表达模式大部分遗传到合成四倍体中。冉丽萍^[61]利用 RNA-Seq 技术分析了人工合成甘蓝型油菜与其亲本的基因表达差异,研究发现,转录组表达在人工合成种与亲本表达中具有一定的差异,表达不存在偏好性;人工合成种中部分同源基因表达模式和亲本一致,这一结论与张大为^[58]的研究一致。人工合成种多倍化过程中,重排后染色体中 DNA 被修饰,转座子转座、反转座子激活或是一些其他具有转录活性的基因组渗入等多个因素,导致其在进化过程中沉默的同源基因重新表达;另外,人工合成种中双亲细胞质与母本细胞质存在核质互作和不兼容,细胞质会对核基因组表达产生一定的影响,加之核仁显性等诸多因素的影响,最终导致了多倍体后代基因表达水平表现出广泛变异^[4, 39]。

3.3 小分子 RNA 变异研究

小分子 RNA (sRNAs)是一类长 20~30 个核苷酸(nucleotide, nt)的非编码 RNA 分子,主要存在于细胞质中。其在植物生长、发育和应答外界胁迫等方面具有重要功能^[62]。近年来相关研究表明:

sRNAs 在多倍体形成过程中具有很重要的调节作用^[63, 64]。高通量测序的发展为研究 sRNAs 变异提供了很好的技术支持, sRNAs 在人工合成甘蓝型油菜后代遗传变异的相关研究中已有报道。如: Fu 等^[69]利用高通量测序技术分析人工合成甘蓝型油菜早期世代(S₁~S₄)和亲本的 sRNAs 变异,发现 sRNAs 和 miRNAs 数量在人工合成种中加倍, sRNAs 的数量在人工合成种后代中表现出不稳定性,源于转座子的 sRNAs 比例增加,与 sRNAs 产物相关的转座子激活,基因调控更加复杂。目前,有关人工合成甘蓝型油菜中 sRNAs 变异的相关报道较少,许多问题还处在初步探索阶段,如 miRNAs 靶基因的预测、定量表达以及在多倍化过程中的功能等诸多问题均有待研究。

4 人工合成甘蓝型油菜在育种中的应用

4.1 人工合成甘蓝型油菜的遗传多样性和杂种优势研究

大量研究表明,经改良可获得具有优良性状的人工合成甘蓝型油菜,而且人工合成甘蓝型油菜遗传多样性丰富,与天然甘蓝型油菜遗传差异大,可有效拓宽天然甘蓝型油菜种质资源遗传多样性,为甘蓝型油菜育种开辟一条新的途径。Seyis 等^[66]研究了利用黄籽“Sarson”和甘蓝为亲本杂交选育的 165 个人工合成甘蓝型油菜品系和 40 个春油菜品种的遗传多样性, AFLP 分子标记进行聚类分析表明人工合成品系遗传多样性丰富,相比春油菜品种具有更加丰富的遗传基础。Guo 等^[67]利用 SSR 分子标记技术研究了 96 份人工合成甘蓝型油菜和 25 份常规甘蓝型油菜的遗传多样性,结果表明:人工合成种具有丰富的遗传多样性,可作为新的种质资源用于育种和遗传学研究。Becker 等^[68]对甘蓝型油菜人工合成种与甘蓝型油菜栽培种间遗传距离及其与杂种优势之间的关系进行了研究,结果表明杂种植株叶干重的中亲优势与遗传距离有显著的相关性($r=0.55$)。同时,该团队利用 RFLP 分子标记对 12 个来源不同的人工合成甘蓝型油菜品系与春油菜品种“Korall”杂交 F₁ 的杂种优势进行了分析,结果表明, F₁ 较双亲产量均高,中亲优势平均可达到 30%左右^[69]。赵勇国^[70]从数量遗传学、细胞遗传学、生理学和分子生物学等多个方面对人工合成甘蓝型油菜在油菜育种中利用的潜力做了评估,认为人工合成甘蓝型油菜可以作为杂交油菜育种的一个重

要的种质资源。

4.2 人工合成甘蓝型油菜的育种应用

自发现人工合成甘蓝型油菜潜在的育种价值后,很多学者将人工合成种引入到了甘蓝型油菜育种过程中,成功获得了一批优良的甘蓝型油菜资源。如:栗根义等^[71]用黄籽白菜型油菜和甘蓝人工合成了黄籽甘蓝型油菜,并利用白菜型油菜雄性不育亲本与甘蓝杂交人工合成了甘蓝型油菜雄性不育植株。牛应泽等^[72]以具有优良性状的人工合成甘蓝型油菜与普通甘蓝型油菜杂交,培育到了一个新甘蓝型油菜胞质雄性不育系,命名为“Bro cms”,并利用该不育系成功选育出了一系列具有长角、大粒等性状的新甘蓝型油菜胞质雄性不育系。富贵等^[24]利用青海大黄为母本,与多个甘蓝品种杂交人工合成了一批大粒甘蓝型油菜,这些甘蓝型油菜千粒重较高,介于 5.482~7.453 g 之间。Rahman 等^[73]以白菜型油菜黄籽沙逊与芥蓝为亲本人工合成了甘蓝型油菜,并利用该人工合成种成功获得了甘蓝型油菜的黄籽品系。Rygullal 等^[74]曾以白菜型油菜和两个不含芥酸的二倍体甘蓝为亲本,培育出了一批具有优良性状而且对黄萎病具有一定抗性的甘蓝型油菜新种质。Szala 等^[75]利用人工合成甘蓝型油菜与携带卡诺拉油菜 *Ogura* 育性恢复基因(*Rfo*)的双低油菜杂交,筛选得到了 4 个具有 *Rfo* 基因的双低品系。由此可见,作为甘蓝型油菜育种的潜在资源,人工合成甘蓝型油菜不仅丰富了现有甘蓝型油菜种质资源,而且在甘蓝型油菜育种中得到了广泛的应用。值得注意的是,多数人工合成种芥酸和硫甙含量较高,不能直接用于育种,需进行品质改良。

5 展望

对人工合成甘蓝型油菜的研究已经进行了近 80 年,从方法研究到人工合成甘蓝型油菜品系选育及其杂种优势的利用研究,这些工作为丰富甘蓝型油菜种质资源和甘蓝型油菜的育种奠定了基础;与此同时,对于芸薹属 A-C 基因组之间进化的研究也取得了丰硕的成果,尤其是 A-C 基因组异源多倍化后基因组水平、基因表达及表观遗传学变异的研究,为进一步探索植物的进化和起源模式及其他种属异源多倍体的进化提供了理论基础。今后对于人工合成甘蓝型油菜的研究一方面要注重在育种中的利用,尤其是对具有优良性状的二倍体亲本进行挖掘以获得优质的人工合成种,

便于对现有的甘蓝型油菜进行改良;另一方面要借助一些新颖、先进的生物技术方法对人工合成种发生的变异进行研究,前人的研究大多利用传统的分子标记技术,具有一定的局限性;此外,对于人工合成甘蓝型油菜后代的基因组变异、表型变异及表观遗传学变异相互关系的研究需进一步加强,这将有助于推动甘蓝型油菜优良基因资源的开发及异源多倍体变异产生机理的深层次探究。

参考文献(References):

- [1] 张菊红. 十字花科植物 *fad2* 基因同源序列的克隆及进化分析[D]. 武汉: 湖北大学(Zhang Ju-hong. Cloning and Evolutionary Analysis of Homologous Sequences of *fad2* Gene in Cruciferae[D]. Wuhan: Hubei University), 2006.
- [2] 富贵. 利用大黄油菜人工合成甘蓝型油菜 S_0, S_1 世代的遗传分析[D]. 西宁: 青海大学(Fu Gui. Genetic Analysis of Artificially Synthesized *Brassica napus* with Dahuang rapa as a Parent in S_0 and S_1 Generations[D]. Xining: Qinghai University), 2013.
- [3] 孔月琴. 人工合成甘蓝型油菜的创建及其表观遗传分析[D]. 扬州: 扬州大学(Kong Yue-qin. Creation of synthesized *Brassica napus* and Its Epigenetic Analysis[D]. Yangzhou: Yangzhou University), 2015.
- [4] 文静. 芸薹属种间杂交合成甘蓝型黄籽油菜及杂交后代的研究[D]. 武汉: 华中农业大学(Wen Jing. Developing Yellow-seed *Brassica napus* Through Interspecific Hybridization in *Brassica* and Studies on the Hybrids and Their Progenies[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University), 2008.
- [5] 邓昌蓉, 赵志刚, 余青兰, 等. 人工合成甘蓝型油菜 S_0-S_3 代 DNA 及 cDNA 的 AFLP 分析[J]. 分子植物育种(Deng Chang-rong, Zhao Zhi-gang, Yu Qing-lan, et al. AFLP analysis on DNA and cDNA in S_0-S_3 generation of artificially synthetic *Brassica napus*[J]. Molecular Plant Breeding), 2014, 12(5): 895-902.
- [6] Levy A A, Feldman M. The impact of polyploidy on grass genome evolution[J]. Plant Physiology, 2002, 130(4): 1587-1593.
- [7] Liu B, Wendel J F. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution[J]. Current Genomics, 2002, 3(6): 1-17.
- [8] Wendel J F. Genome evolution in polyploids[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(1): 225-249.
- [9] Martienssen R A, Colot V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants fungi [J]. Science, 2001, 293 (5532): 1070-1074.
- [10] Nagahara U. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization[J]. Japanese Journal of Botany, 1935, 7: 389-452.
- [11] Olsson G. Species crosses within the genus *Brassica*[J]. Hereditas, 1960, 46(1-2): 171-223.
- [12] Nishiyama I, Sarashima M, Matsuzawa R. Critical discussion on abortive interspecific crosses in *Brassica*[J]. Plant Breeding, 1991, 107(4): 288-302.
- [13] Dale P J. Spread of engineered genes to wild relatives[J]. Plant Physiology, 1992, 100(1): 13-15.

- [14] Zhang G Q, Tang G X, Song W J, *et al.* Resynthesizing *Brassica napus* from interspecific hybridization between *Brassica rapa* and *B. oleracea* through ovary culture[J]. *Euphytica*, 2004, 140(3): 181–187.
- [15] Heath D W, Earle E D. Resynthesis of rapeseed (*Brassica napus* L.): a comparison of sexual versus somatic hybridization[J]. *Plant Breeding*, 1996, 115(5): 395–401.
- [16] Lu C M, Zhang B, Kakihara F, *et al.* Introgression of genes into cultivated *Brassica napus* through resynthesis of *B. napus* and the accompanying change in fatty acid composition[J]. *Plant Breeding*, 2001, 120(5): 405–410.
- [17] Nishi S, Kawata J, Toda M. On the breeding of interspecific hybrids between two genomes “c” and “a” of *Brassica* through the application of embryo culture techniques[J]. *Japanese Journal of Breeding*, 1959, 8(4): 215–222.
- [18] Inomata N. Production of interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *Brassica oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries: I. Effects of yeast extract and casein hydrolysate on the development of excised ovaries[J]. *Japanese Journal of Breeding*, 1977, 27(4): 295–304.
- [19] 张晓伟, 高睦枪, 原玉香, 等. 人工合成甘蓝型油菜研究[J]. 河南农业科学(Zhang Xiao-wei, Gao Mu-qiang, Yuan Yu-xiang, *et al.* Studies on artificially synthesized *B. napus* L.], *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2001, (2): 7–10.
- [20] Zhang G Q, Zhou W J, Gu H H, *et al.* Plant regeneration from the hybridization of *Brassica juncea* and *B. napus* through embryo culture[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2003, 189(5): 347–350.
- [21] Seyis F, Friedt W. *Brassica oleracea* genotypes displaying interesting fatty acid profiles for *Brassica napus* breeding[J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2010, 5(23): 3191–3195.
- [22] 李俊, 罗莉霞, 王转, 等. 人工合成具有白菜或甘蓝细胞质的甘蓝型油菜[J]. 作物学报(Li Jun, Luo Li-xia, Wang Zhuan, *et al.* Resynthesis of *Brassica napus* with *Brassica oleracea* or *Brassica rapa* cytoplasm[J]. *Acta Agronomica Sinica*), 2010, 36(8): 1280–1285.
- [23] Wen J, Tu J, Li Z, *et al.* Improving ovary and embryo culture techniques for efficient resynthesis of *Brassica napus* from reciprocal crosses between yellow-seeded diploids *B. rapa* and *B. oleracea*[J]. *Euphytica*, 2008, 162(1): 81–89.
- [24] 富贵, 赵志刚, 杜德志. 利用青海大黄油菜和芥蓝合成大粒甘蓝型油菜[J]. 中国油料作物学报(Fu Gui, Zhao Zhi-gang, Du De-zhi. Large seed resynthesized *Brassica napus* from hybrid of *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* var *alboglabra*[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*), 2012, 34(2): 136–141.
- [25] Fahlison J, Rahlen L, Glimelius K. Analysis of plants regenerated from protoplast fusion between *B. napus* and *Eruca sativa*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1988, 76(4): 507–512.
- [26] Landgren M, Glimelius K. A high frequency of intergenomic mitochondrial recombination and an overall biased segregation of *B. campestris* or recombined *B. campestris* mitochondria were found in somatic hybrids made within Brassicaceae[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 87: 854–862.
- [27] Röbbelen G. Accessible and exploitable diversity for oilseed breeding[J]. *Progress in Lipid Research*, 1994, 33(1–2): 137–145.
- [28] Heneen W K, Chen B Y, Cheng B F, *et al.* Characterization of the A and C genomes of *Brassica campestris* and *B. alboglabra*[J]. *Hereditas*, 1995, 123: 251–267.
- [29] 张颖, 牛应泽. 人工合成甘蓝型大粒材料 H484 花粉生活力及减数分裂观察[J]. 四川农业大学学报(Zhang Ying, Niu Ying-ze. Observations of the pollen fertility and the meiosis of a resynthesized large seed *B. napus* line H484[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*), 2003, 21(4): 289–291.
- [30] 张颖. 人工合成甘蓝型油菜几个特异材料的细胞遗传学研究[D]. 雅安: 四川农业大学(Zhang Ying. *Cytogenetics Studies of Several Resynthesized Rapeseed Lines with Special Significant Characteristics*[D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University), 2004.
- [31] 李俊, 方小平, 罗莉霞, 等. 人工合成甘蓝型油菜减数分裂中的染色体行为观察[J]. 江西农业学报(Li Jun, Fang Xiao-ping, Luo Li-xia, *et al.* Observation on chromosome behavior during meiosis of resynthesized *B. napus*[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*), 2010, 22(1): 1–4.
- [32] Ohmido N, Ueda K, Fujii K. Chromosome instability of allopolyploid resynthesized *Brassica napus*[J]. *Chromosome Science*, 2015, 18: 79–84.
- [33] Röbbelen G. Beiträge zur analyse des *Brassica* genomes[J]. *Chromosoma*, 1960, 11(1): 205–228.
- [34] Song K M, Osborn T C, Willaims P H. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1988, 75(5): 784–794.
- [35] Sloeum M K, Figdore S S, Kennard W C, *et al.* Linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleracea*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 80(1): 57–64.
- [36] Chyi Y S, Hoenecke M E, Sernyk J L. A genetic linkage map of restriction fragment length polymorphism loci for *Brassica rapa* (syn. *campestris*)[J]. *Genome*, 1992, 35(5): 746–757.
- [37] Jackson S A, Cheng Z K, Wang M L, *et al.* Comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansion of the *Brassica rapa* genome[J]. *Genetics*, 2000, 156(2): 833–838.
- [38] Parkin I A, Sharpe A G, Lydiat D J. Patterns of genome duplication within *Brassica napus* genome[J]. *Genome*, 2003, 46(2): 291–303.
- [39] Zhou J, Tan C, Cui C, *et al.* Distinct subgenome stabilities in synthesized *Brassica* allohexaploids[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(7): 1257–1271.
- [40] Cui C, Ge X, Gautam M, *et al.* Cytoplasmic and genomic effects on meiotic pairing in *Brassica* hybrids and allotetraploids from pair crosses of three cultivated diploids[J]. *Genetics*, 2012, 191(3): 725–738.
- [41] Mason A S, Takahira J, Atri C, *et al.* Microspore culture reveals complex meiotic behaviour in a trigonomic *Brassica* hybrid[J]. *BioMed Central Plant Biology*, 2015, 15: 173.
- [42] Prakash S, Bhat S R, Quiros C F, *et al.* *Brassica* and its close allies: cytogenetics and evolution[J]. *Plant Breeding Reviews*, 2009, 31(23): 21–187.
- [43] Jenczewski E, Eber F, Grimaud A, *et al.* A major gene controlling homeologous pairing in oilseed rapa (*Brassica napus*) haploids[J]. *Genetics*, 2003, 164(2): 645–653.

- [44] Xiong Z, Gaeta R T, Pires J C, *et al.* Homeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2011, 108(19): 7908–7913.
- [45] Kenton A, Parokony A S, Gleba Y Y, *et al.* Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetic[J]. Molecular and General Genetics, 1993, 240(2): 159–169.
- [46] Chen Z J, Pikaard C S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance[J]. Genes and Development, 1997, 11(16): 2124–2136.
- [47] Cui L, Wall P K, Leebens-Mack J H, *et al.* Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants[J]. Genome Research, 2006, 16(6): 738–749.
- [48] Song K, Lu P, Tang K, *et al.* Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1995, 92(17): 7719–7723.
- [49] Parkin I A P, Sharpe A G, Keith D J, *et al.* Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape)[J]. Genome, 1995, 38(6): 1122–1131.
- [50] Lukens L, Quijada P A, Udall J, *et al.* Genome redundancy and plasticity within ancient and recent *Brassica* crop species[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2004, 82(4): 665–674.
- [51] Gaeta R T, Pires J C, Iniguez-Luy F, *et al.* Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype[J]. The Plant Cell, 2007, 19(11): 3403–3417.
- [52] Gaeta R T, Chris Pires J. Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet[J]. New Phytologist, 2010, 186(1): 18–28.
- [53] Xu Y H, Zhong L, Wu X M, *et al.* Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized *Brassica napus* allopolyploids[J]. Planta, 2009, 229(3): 471–483.
- [54] 刘红磊. 人工合成甘蓝型油菜不同世代中转座子甲基化变化规律的研究[D]. 重庆: 西南大学(Liu Hong-lei. Alterations of the Methylation Patterns Around the Transposable Elements in the First Four Generations of the Synthetic *Brassica napus* Allotetraploid[D]. Chongqing: Southwest University), 2014.
- [55] Ran L P, Fang T T, Rong H, *et al.* Analysis of cytosine methylation in early generations of resynthesized *Brassica napus*[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(6): 1228–1238.
- [56] Gao Y, Ran L, Kong Y, *et al.* Assessment of DNA methylation changes in tissue culture of *Brassica napus*[J]. Russian Journal of Genetics, 2014, 50(11): 1186–1191.
- [57] Woodhouse M R, Cheng F, Pires J C, *et al.* Origin, inheritance, and gene regulatory consequences of genome dominance in polyploids[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2014, 111(14): 5283–5288.
- [58] 张大为. 人工合成芸薹属杂种及异源四倍体的转录组研究[D]. 武汉: 华中农业大学(Zhang Da-wei. Transcriptome Analysis of Synthesized *Brassica* Hybrids and Allotetraploids[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University), 2016.
- [59] 陈新. 油菜亚基因组杂种和亲本的基因表达差异研究[D]. 武汉: 华中农业大学(Chen Xin. Gene Different Expression Between Intersubgenomic Hybrid and Its Parents in *Brassica napus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University), 2008.
- [60] Jiang J, Shao Y, Du K, *et al.* Use of digital gene expression to discriminate gene expression differences in early generations of resynthesized *Brassica napus* and its diploid progenitors[J]. BioMed Central Genomics, 2013, 14: 72.
- [61] 冉莉萍. 人工合成甘蓝型油菜的遗传和表观遗传变异分析[D]. 扬州大学(Ran Li-ping. Analysis of Genetic and Epigenetic Variation of the Resynthesized *Brassica napus*[D]. Yangzhou: Yangzhou University), 2017.
- [62] 卫波, 张荣志, 李爱丽, 等. 利用高通量测序技术发现植物小分子 RNA 研究进展[J]. 中国农业科学(Wei Bo, Zhang Rongzhi, Li Ai-li, *et al.* Progress in plant small RNA research via high-throughput sequencing[J]. China Agriculture Science), 2009, 42(11): 3755–3764.
- [63] Chen Z J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor[J]. Trends Plant Science, 2010, 15(2): 57–71.
- [64] Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, *et al.* Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome[J]. Science, 2014, 345(6199): 950–953.
- [65] Fu Y, Xiao M, Yu H, *et al.* Small RNA changes in synthetic *Brassica napus*[J]. Planta, 2016, 244(3): 607–622.
- [66] Seyis F, Snowdon R J, Luhs W, *et al.* Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars[J]. Plant Breeding, 2003, 122(6): 473–478.
- [67] Guo S, Zhang X, Zeng D, *et al.* Genetic diversity of resynthesized *Brassica napus*, lines from SW China assessed by main agronomic traits and SSR markers in comparison with common *B. napus* lines[J]. Euphytica, 2016, 207(1): 95–108.
- [68] Becker H C, Engqvist G M. The potential of resynthesized rapeseed for hybrid breeding[C]//Proceedings of 9th International Rapeseed Conference. Cambridge, 1995: 113–115.
- [69] Becker H C, Engqvist G M, Karlsson B. Comparison of rapeseed cultivars and resynthesized lines based on allozyme and RFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(1): 62–67.
- [70] 赵勇国. 人工合成甘蓝型油菜杂种优势与利用研究[D]. 北京: 中国农业科学院(Zhao Yong-guo. Heterosis of Resynthesized *Brassica napus* and Its Utilization in Hybrid Breeding[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2009.
- [71] 栗根义, 高睦枪, 杨建平. 利用人工合成甘蓝型油菜建立白菜-甘蓝附加系[J]. 华北农学报(Li Gen-yi, Gao Mu-qiang, Yang Jian-ping. Creation of *Brassica campestris-oleracea* addition lines from the artificially synthesized *B. napus* with morphological characters as gene markers[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica), 1993, 8(4): 41–45.
- [72] 牛应泽, 汪良中, 刘玉贞, 等. 利用人工合成甘蓝型油菜创建油菜新种质[J]. 中国油料作物学报(Niu Ying-ze, Wang Liang-zhong, Liu Yu-zhen, *et al.* Development of new germplasm in rapeseed through resynthesis of new *Brassica napus* L.[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences), 2003, 25(4): 11–12.
- [73] Rahman M H. Production of yellow-seed *Brassica napus* through interspecific crosses[J]. Plant Breeding, 2001, 120(6): 463–472.
- [74] Rygulla W, Friedt W, Seyis F, *et al.* Combination of resistance to *Verticillium longisporum* from zero erucic acid *Brassica oleracea* and oilseed *Brassica rapa* genotypes in resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines[J]. Plant Breeding, 2007, 126(6): 596–602.
- [75] Szała L, Sosnowska K, Popławska W, *et al.* Development of new restorer lines for CMS *ogura* system with the use of resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.)[J]. Breeding Science, 2016, 66(4): 516–521.