

中国原产十字花科植物诸葛菜的基因组及遗传研究

潘琪¹, 李再云²

(¹贵州中医药大学中药民族药资源研究院, 贵阳 550025; ²华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 诸葛菜(*Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz, 别称二月兰)为我国原产的十字花科观赏植物,也是芸苔属作物遗传改良的种质资源。本研究总结了诸葛菜的细胞遗传学、与芸苔属栽培种杂种的细胞学行为、性状的染色体定位、长链双羟基脂肪酸的发现等方面的研究进展。诸葛菜(2n=24)的基因组较大(大约1.3 Gb)、染色体较长、染色均匀。诸葛菜及其单倍体的减数分裂配对行为揭示出其基因组的同源多倍体性质。最新的基因组测序结果也表明,诸葛菜二倍体祖先具有x=7的tPCK核型,其在大约600~800万年前经历了一次特异的基因组四倍化事件,然后经过染色体重组及着丝粒失活产生现在n=12的基因组。诸葛菜(父本)与芸苔属6个栽培种(母本)的属间杂种所表现出的母本特异的细胞学行为,与双亲的基因组结构和固有的染色体行为有关;诸葛菜染色体因表现体积较大与染色较深的特征,而易于与芸苔属染色体相区别。通过创建甘蓝型油菜-诸葛菜附加系,将诸葛菜的锯齿叶、基部多分枝、紫花、双羟基脂肪酸合成等几个性状定位到特定的染色体上。诸葛菜种子油中富含长链双羟基脂肪酸,具有比蓖麻油更好的润滑效果。诸葛菜还具有潜在的药用价值。最后,对今后诸葛菜的研究方向及利用进行了讨论。

关键词: 诸葛菜;基因组;细胞遗传学;多倍性;芸苔属

Genome and Genetics of the Crucifer *Orychophragmus violaceus* Native to China

PAN Qi¹, LI Zai-yun²

(¹Resource Institute for Chinese & Ethnic Materia Medica, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025;

²College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: The crucifer *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz (syn. *Moricandia sonchifoli* (Bunge) Hook. f.) is an ornamental plant native to China and serves as the germplasm resource in the genetic improvement of the *Brassica* L. crops. In this paper, the research progress and status of its cytogenetics, cytological behavior of its intergeneric hybrids with the *Brassica* L. crops, the chromosomal localization of some traits, and the discovery of the dihydroxylated fatty acids are summarized. *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz (2n=24) has the large genome size of about 1.3 Gb and the long chromosomes with the homogenous staining. The meiotic pairing patterns of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz and its haploid reveal the polyploidy nature of its genome. The latest results from the genome sequencing revealed that the ancestral diploid of this species should likely have the tPCK karyotype with x=7, and experienced one specific tetraploidization event occurring at 600-800 million years ago, which gave rise to the extant genome of n=12 by chromosomal rearrangements and the inactivation of centromeres. With *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz as the male parent, the intergeneric hybrids with six cultivated *Brassica* L. species give the cytogenetical behaviors specific to each *Brassica* L. parent, which are likely associated with the genome structures and inherent cytological patterns of two parents. The chromosomes from *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz are clarified easily from those of *Brassica* L. species in these

收稿日期: 2022-09-05 修回日期: 2022-09-12 网络出版日期: 2022-10-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220905001>

第一作者研究方向为中药资源与开发, E-mail: qiling5733@126.com

通信作者: 李再云, 研究方向为油菜远缘杂交及细胞遗传学, E-mail: lizaiyun@mail.hzau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(39300081, 39770467, 30070413)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (39300081, 39770467, 30070413)

hybrids, as they are of larger size and more deeply stained. The traits of the serrated leaves, the basal clustering stems, purple petals and dihydroxylated fatty acids are localized on different chromosomes via the development of the *Brassica napus* L.-*O. violaceus* (L.) O. E. Schulz additional lines. The dihydroxy fatty acids with high content are discovered in its seed oil and present the better lubricant effect than the castor oil. *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz has also potential medicinal value. Finally, the future research area and utilization for *Orychophragmus* Bunge species are discussed.

Key words: *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz; genome; cytogenetics; polyploidy; *Brassica* L.

诸葛菜 (*Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz) 是十字花科诸葛菜属的一年或二年生草本植物, 相传诸葛亮率领的蜀军北伐出征时因军粮不足采摘其嫩茎食用而得名。诸葛菜原产于中国, 在我国广泛分布, 朝鲜也有分布^[1]。因农历二月前后开始开蓝紫色花, 故也称二月兰, 极具观赏性。诸葛菜属的系统分类及进化关系比较独特, 似乎与十字花科中其他进化枝不能聚到一起, 而被称为漂浮属 (Floating genera)^[2]。诸葛菜属内种、亚种或变种的划分都还没有最后确定, 故统称诸葛菜复合群 (*Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz complex)^[3-5]。就染色体数目而言, 报道有 $2n=20, 22, 24, 48$ 四种数目^[3-6]。常见的诸葛菜 (*O. violaceus* (L.) O. E. Schulz) 为 $2n=24$, 而在太白山发现 $2n=48$ 的类型, 可能是 $2n=24$ 的染色体类型加倍后产生的同源四倍体^[3-4]。 $2n=20$ 的命名为铺散诸葛菜 (*O. diffuses* Z. M. Tan & J. M. Xu)、 $2n=22$ 的为湖北诸葛菜 (*O. hupehensis* (Pamp.) Z. M. Tan & X. L. Zhang), 二者有特异的形态特征, 与常见的诸葛菜有较大差异, 特别是较矮小的植株可能与减少的染色体数相关。另外, 心叶诸葛菜 (*O. limprichtianus* (Pax) Al-Shehbaz & G. Yang; 别名心叶华葱芥, *Sinallaria limprichtiana* (Pax) X. F. Jin, Y. Y. Zhou & H. W. Zhang) 的染色体数为 $2n=28$, 开小白花, 与诸葛菜复合群的物种可能有较远的亲缘关系。

诸葛菜作为种质资源, 具有一些芸苔属作物或其他植物遗传改良可用的性状, 如紫花、长角果/角粒数多/粒大、长链双羟基脂肪酸等, 过去近 40 年间在诸葛菜的细胞遗传学、远缘杂交及脂肪酸组成等方面进行了较系统与深入的研究。本研究就这些方面的研究进展进行总结, 讨论可能的机理, 为今后研究与利用提供参考。

1 诸葛菜的细胞遗传学

1.1 诸葛菜的染色体核型

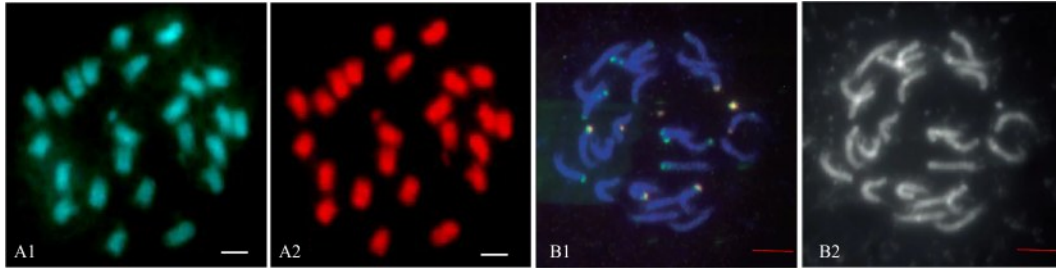
诸葛菜 (*O. violaceus* (L.) O. E. Schulz) 具有

24 条染色体, 每对染色体间的长度呈梯度变化, 差别不大^[7-8] (图 1 A1、A2)。着丝粒位于多数染色体的中部、少数染色体的近中部, 故在染色体核型 (Karyotype) 研究中划分为中部或近中部染色体。经普通细胞学的染料品红 (Fuchsin) 染色后, 有丝分裂中期染色体沿全长染色均匀, 除着丝粒及次缢痕区域外没有明显的染色深浅差异。以诸葛菜自身的基因组 DNA 为探针进行基因组原位杂交 (GISH) 后, 杂交信号在全部染色体的全长上均匀分布 (图 1 A1、A2), 显示其染色体富含中度重复序列且沿全长分布^[9], 这与芸苔属植物染色体的 GISH 信号主要位于着丝粒部位不同。特别的是, 诸葛菜的染色体明显比芸苔属栽培种的长与粗^[10] (图 2), 平均长度大约为芸苔属的 1.5 倍, 与其细胞内较大的 DNA 量 (约 1.3 Gb) 相符, 和甘蓝型油菜 ($2n=38$) 的相当。

利用双色 FISH 技术, 确定了诸葛菜染色体上的 5S 与 45S 核糖体 RNA (rRNA) 基因位点 (图 1 B1、B2), 在 18 条或 9 对染色体的端部发现 22 个体积不一的 5S rDNA 位点, 其中 4 条染色体的末端出现 5S rDNA 双位点——即同一染色体臂上由一短距离隔开的两个荧光强度不同的两个位点, 远端的比近端的荧光更强, 但这些染色体上均没有携带 45S rDNA 位点^[11]。在 8 条染色体的末端检测到 8 个大小不同的 45S rRNA 基因位点, 所有 8 个 45S rDNA 位点均与 5S rDNA 位点共定位, 5S rDNA 位点在近端部位, 而 45S rDNA 位点在远端部位。但诸葛菜只有 3 对随体染色体, 故 1 对染色体上的 45S rDNA 位点没有转录活性。在甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L., $2n=38$, AACC) 诸葛菜异源五倍体 ($2n=50$, AACCO) 的 12 条诸葛菜染色体中也是 3 条染色体具有随体^[11] (图 2 C1、C2); 且其中 1 条诸葛菜染色体在甘蓝型油菜背景下也形成随体 (图 2 D1、D2), 利用单链构象多态性 (SSCP, single-strand conformation polymorphism) 技术只发现来自诸葛菜的 rRNA 基因转录, 没有检测出甘蓝型油菜的 rRNA 基因转录, 故该诸葛菜染色体上 rRNA 基因对甘蓝型油菜的表现

完全显性^[12]。而另外两条诸葛菜染色体上的rRNA基因对甘蓝型油菜的为部分显性,因甘蓝型油菜的rRNA也有表达。因此,诸葛菜的基因组较大(大约1.3 Gb),为芸薹属二倍体种的二倍,与异源四倍体

种甘蓝型油菜的相当,故染色体较长,每条染色体长度差别小,染色均匀。染色体上的多个rDNA位点暗示其基因组的多倍体性质。这些染色体特征为在杂种细胞中区分亲本染色体的细胞学标记。



A1~A2: 以诸葛菜基因组DNA为探针进行基因组原位杂交后的诸葛菜染色体^[9]。A1:DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)染色的染色体(2n=24)。A2:来自Cy3的红色原位杂交信号在染色体上的均匀分布。标尺:5 μm。B1~B2: 诸葛菜染色体上5S和45S rDNA位点的双色荧光原位杂交(FISH)检测^[11]。B1: 双色FISH后的合成细胞图,红色显示45S rDNA位点(8个),绿色显示5S rDNA位点(22个)。

B2:DAPI染色后的染色体。标尺:10 μm

A1~A2: The chromosomes of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz after GISH with its genomic DNA as the probe^[9]. A1: The chromosomes after stained by DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)(2n=24). A2: The homogenous distribution of the red signal from Cy3 along the whole chromosomes. Bar: 5 μm. B1~B2: Double FISH of 5S and 45S rDNA gene loci on the mitotic chromosomes of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz^[11]. B1: Merged image with 8 45S rDNA loci (red) and 22 5S rDNA loci (green). B2: The chromosomes stained by DAPI. Bar: 10 μm

图1 诸葛菜的体细胞染色体及rDNA位点

Fig.1 The somatic chromosomes and rDNA loci in *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz

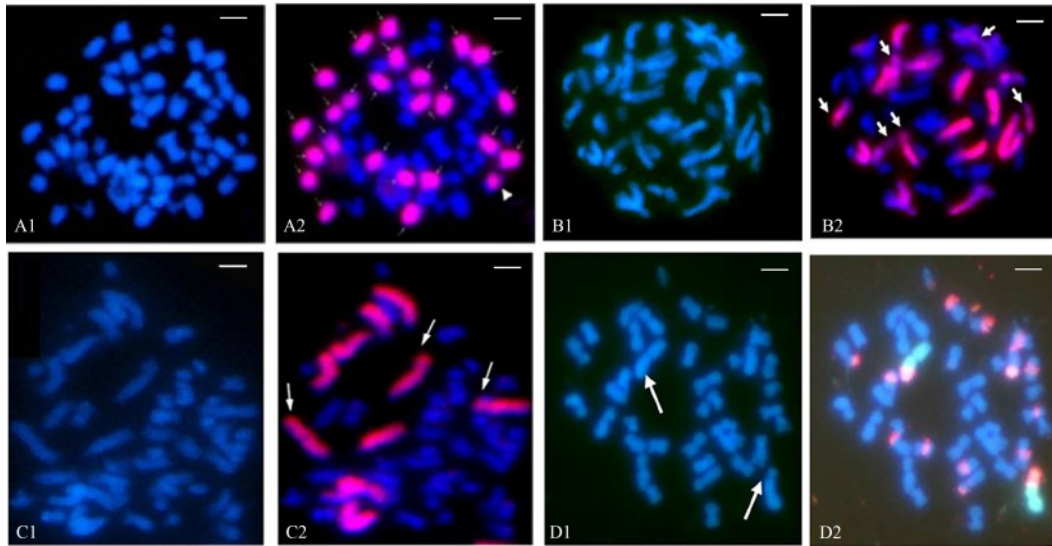
1.2 诸葛菜基因组的同源多倍性

诸葛菜的24条染色体在花粉母细胞减数分裂中,主要配对构型为12个二价体,其余的则同时形成不同数目的二价体和各种多价体(四价体、六价体、八价体等)(图3),显示出染色体对间的(部分)同源关系^[13-14]。在诸葛菜花药培养产生的单倍体的花粉母细胞中,共观察到24种染色体配对构型^[15]。染色体可联会形成单价体、二价体、三价体和四价体(图3),单价体数变化在0~12个,二价体数变化在0~6个,三价体数变化在0~2个,四价体数变化在0~3个,平均配对构型为 $n=12=6.352\text{II}+2.008\text{III}+0.384\text{IV}+0.12\text{VI}$,其中I为单价体,II为二价体,III为三价体,VI为四价体。染色体联会形成二价体及三价体和四价体的细胞比例达到96%,只有4%的细胞形成12个单价体。特别的是,12条染色体甚至可配对形成3个四价体。这进一步证明诸葛菜基因组内染色体间的高度同源性、同源多倍性,可能为染色体基数 $x=6$ 的同源四倍体、 $x=3$ 的同源八倍体。诸葛菜的8条染色体上载有45S rDNA位点,也为其多倍体性质提供了分子细胞学证据。另外,Lysak等^[16]通过染色体涂染(Chromosome painting)分析发现,诸葛菜减数分裂粗线期染色体具有十字花科祖先核型的保守区段F和U的2个拷贝,也揭示其基

因组的四倍体性质。

1.3 诸葛菜的基因组四倍化事件

诸葛菜基因组测序结果^[17-18]均显示诸葛菜二倍体祖先基因组在600~800万年前经历了一次特异的基因组四倍化事件,该事件与芸薹属二倍体种的古六倍化事件是相互独立的。与其他测序物种的序列比较分析显示,诸葛菜二倍体祖先的核型应为 $x=7$ 的tPCK(translocated proto-Calepeneae karyotype)核型。具有 $n=14$ 的重复的tPCK基因组内,其中9条祖先染色体通过大片的易位及两个着丝粒的失活产生7条现在的染色体,其余的5条祖先染色体遗传为现在的5条染色体。故在诸葛菜的染色体间存在不同程度的部分同源性;除二价体外的多种多价体的出现^[13-14],也表明其减数分裂的配对行为还没有完全的二倍体化,也没有进化出抑制部分同源配对的遗传系统。诸葛菜的较大基因组(约1.3 Gb)主要是由于重复序列的大规模扩张,特别是长末端重复反转录转座子(LTR-RTs, long terminal repeat retrotransposons)占DNA序列的一半。基于诸葛菜与其他十字花科测序物种的基因组比较分析,发现诸葛菜在系统进化关系上属于芸苔科3个系谱中的系谱II(Brassicaceae lineage II),与芸苔属较近,而拟南芥属于系谱I。



A1~A2: 具有双亲甘蓝型油菜 (AACC) 和诸葛菜 (OO) 染色体数之和的一个杂种细胞 ($2n=24+38=62$, AACCO) 的 GISH 分析, 以诸葛菜基因组 DNA 为探针, 杂交信号为红色^[10]。A1: DAPI 染色的染色体, 具有一些体积较大与染色深的染色体。A2: 24 条标记的诸葛菜染色体均较大与染色较深。B1~B2: 处于前中期的 1 个体细胞杂种 ($2n=62$)。B1: DAPI 染色的染色体。B2: 较长的染色体均被诸葛菜 DNA 探针标记, 且可辨认出 6 条随体染色体 (箭头所示)。C1~C2: 回交一代五倍体 (AACCO) 的前中期细胞。C1: DAPI 染色的染色体, 染色体的长度差异尤为明显。C2: 12 条标记的诸葛菜染色体显著较长, 3 条染色体上的随体清晰可见 (箭头所示)。D1~D2: $2n=40$ 的甘蓝型油菜-诸葛菜二体附加系的体细胞。D1: DAPI 染色的染色体, 箭头所示为两条较长的、具有随体的诸葛菜染色体。D2: rDNA 位点定位。虽然多条甘蓝型油菜染色体也具有 rDNA 位点 (红色), 但没有随体形成 (D2)。两条诸葛菜染色体的 GISH 信号为绿色。标尺: $5\ \mu\text{m}$

A1-A2: One hybrid cell with the sum of the chromosomes from both parents, *B. napus* L and *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz ($2n=24+38=62$, AACCO)^[10]. A1: DAPI image with some larger and more deeply stained chromosomes. A2: The merged image showing 24 labeled chromosomes by the *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz probe (red), which correspond to the larger and more deeply stained ones in A. B1-B2: One prometaphase cell of the hybrid. B1: DAPI image. B2: The labelled chromosomes from *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz are much longer than those from *B. napus* L, and six satellited ones are identifiable (arrows). C1-C2: One prometaphase cell of the BC₁ plant (AACCO). C1: DAPI image. C2: The 12 labelled chromosomes from *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz are obviously much longer than those from *B. napus* L, and the satellites on three chromosomes ones are clear (arrows). D1-D2: One metaphase cell of the disomic additional line ($2n=40$). D1: DAPI image, arrows indicate the two larger and satellited chromosomes from *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz. D2: The rDNA loci (red) are detected on many chromosomes from *B. napus* L, but no satellites are formed. The two chromosomes from *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz are labelled green by GISH. Bar: $5\ \mu\text{m}$

图2 诸葛菜与甘蓝型油菜属间体细胞杂种及后代的诸葛菜染色体特征及核仁显性

Fig.2 The chromosomal characteristics and nucleolar dominance of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz in its intergeneric somatic hybrids and progenies

2 诸葛菜与芸苔属杂种的细胞遗传学

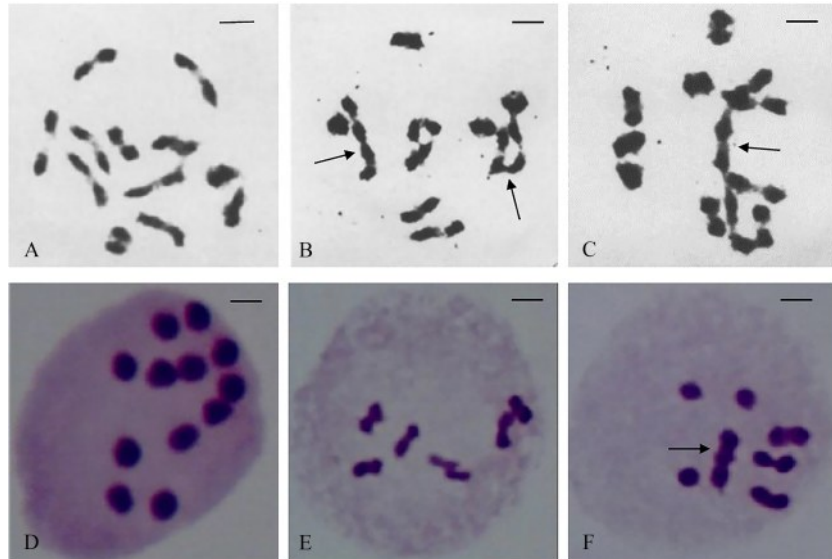
以诸葛菜为父本, 与芸苔属 6 个栽培种的属间有性杂交均产生了杂种, 但只有与甘蓝的杂种为具有预期染色体数的经典杂种 (Classical hybrids), 其余的杂种都是具有非预期染色体组成的非经典杂种 (Nonclassical hybrids); 而以诸葛菜为母本的反交组合, 均未获得杂种^[14, 19-21]。这些非预期的杂种为核型不稳定的混倍体, 包含染色体数不同的细胞; 其产生的主要细胞学机制为在杂种细胞有丝分裂过程中双亲染色体组的完全与部分分开, 完全分开后形成分别具有芸苔属物种染色体组和诸葛菜染色体组的两类细胞, 部分分开后形成分别具有两个亲本部分染色体组成的细胞、一个亲本的染色体组

上附加另一个亲本部分染色体的细胞、双亲间代换染色体组成的细胞^[22-23]。杂种及后代的细胞遗传学分析表明, 杂种体内的大多数细胞具有完整的芸苔属亲本染色体组成, 故其他染色体组成的细胞特别是诸葛菜染色体较多的细胞可能由于较弱的竞争力而被消除。诸葛菜与每一个芸苔属物种的杂种表现特异的细胞学行为, 与二倍体种杂种的行为可预测或解释与四倍体杂种的行为。这一系统研究所产生的成果《芸苔属栽培种与诸葛菜属间杂种的遗传规律及新材料创建》获得 2003 年度教育部自然科学奖一等奖。

诸葛菜染色体的细胞学特征 (较大及长的染色体、染色均匀) 在与芸苔属几个物种的杂种中均表现出来, 从而得以在普通细胞学观察技术下辨认及区分双亲染色体 (图 2、图 4)。在减数分裂的中期 I

及以后时期,花粉母细胞中体积明显较大和染色较深的一些染色体可能来自诸葛菜;减数分裂中双亲染色体在体积和染色上的差异比有丝分裂中更加显

著,可能是减数分裂的时期更长、染色体变化更加复杂,染色体结构差异更充分展现出来^[10, 12, 14, 19-20](图2、图4)。



A-C: 诸葛菜的减数分裂配对^[14]。A: 12个二价体; B: 8个二价体、2个四价体(箭头); C: 8个二价体、1个八价体(箭头)。D-F: 诸葛菜单倍体的减数分裂配对^[15]。D: 12个单价体; E: 6个二价体; F: 3个单价体、3个二价体、1个三价体(箭头)。标尺: 5 μ m

A-C: Meiotic pairings of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz^[14]. A: 12 bivalents; B: 8 bivalents, 2 quadrivalents (arrows); C: 8 bivalents, 1 octavalent (arrow). D-F: Meiotic pairings of the haploid^[15]. D: 12 univalents; E: 6 bivalents; F: 3 univalents, 3 bivalents, 1 trivalent (arrow). Bar: 5 μ m

图3 诸葛菜及其单倍体的减数分裂配对

Fig.3 Meiotic pairings of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz and its haploid

在诸葛菜与芸苔属杂种中发生的双亲染色体组分分开及诸葛菜染色体消除,特别是每一个杂种特异性的染色体行为,很可能与双亲染色体的固有细胞学特性、基因组的结构有关。在有丝分裂的前中期(Prometaphase),3个芸苔属二倍体(白菜、甘蓝、黑芥)的所有染色体的着丝粒近端区域均展现出清晰的异染色质区段,部分染色体臂的末端还有弱小的凝缩区段^[24]。在减数分裂的终变期,白菜的二价体展示高度浓缩与深度染色的着丝粒区域、浓缩较松与染色较浅的染色体端部,在中部与亚中部着丝粒特别明显,并可根据这些特征识别每个二价体,特别是具有随体的二价体^[25]。黑芥的二价体也具有高度浓缩与染色较深的着丝粒区域及染色体末端^[26](图5)。相反的,甘蓝二价体没有或只有轻微的染色质浓缩差别^[25](图5)。白菜和甘蓝染色体所表现出的细胞学特性差异在甘蓝型油菜、白菜-甘蓝附加系中仍然保留,并可作为区分染色体来源的细胞学标记^[25, 27]。与甘蓝二价体相似,诸葛菜二价体也表现均匀的浓缩与染色,没有浓缩程度与染色深浅的明显差异^[12-13](图3)。也许正是由于甘蓝和诸葛菜的染色体具有相似的细胞学特性(均一的染色

体浓缩与染色),才保证它们的染色体在杂种细胞分裂过程中的协调行为,不发生染色体的丢失,特别是体积较大的诸葛菜染色体的丢失^[20-21]。诸葛菜与白菜、黑芥杂种内诸葛菜染色体的全部或部分丢失,则可能是由于双亲染色体在细胞学特性上的差异引起细胞周期不同步(图4),导致诸葛菜染色体的丢失^[20]。诸葛菜较大的基因组(几乎是芸苔属二倍体的2倍)也是导致其染色体丢失的另一原因。

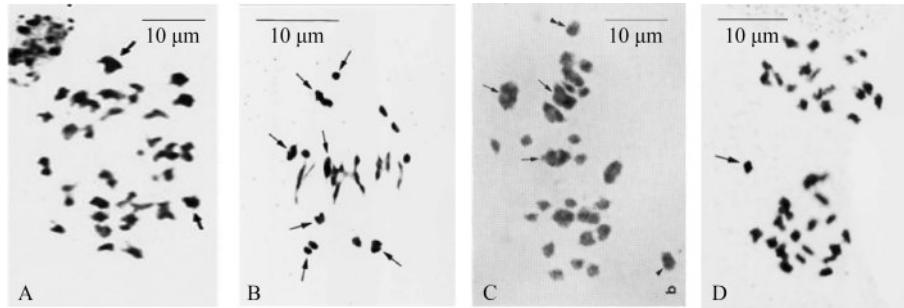
诸葛菜与芸苔属3个四倍体种的特异细胞学行为,也与芸苔属亲本的基因组组成有关。与包含甘蓝C亚基因组的甘蓝型油菜及埃塞俄比亚芥的杂种的细胞学行为较为相似,与芥菜型油菜杂种的染色体行为有一定差异^[14, 19]。双亲染色体在体积与染色程度上的差异,在与白菜、黑芥和芥菜型油菜的杂种及后代中最为明显,来自诸葛菜的染色体因染色深而很容易识别^[19-20](图4)。

3 诸葛菜性状的染色体定位

通过甘蓝型油菜和诸葛菜的体细胞杂种($2n=52$, AACCOO)与甘蓝型油菜连续回交^[10-12],在后代

群体中鉴定出全套 12 个附加系中的 9 个, 单体附加系人为编号 MAAL1~MAAL9, 形态特征如下: MAAL1 表现诸葛菜的锯齿状叶特性。MAAL2 偏向于甘蓝型油菜亲本, 叶卵圆且小, 花小, 生长势比亲本弱。MAAL3 的花瓣边缘皱缩褪色, 直至变为白色。MAAL4 的花是黄色, 但二体附加系产生红色花瓣, 开花后红色逐渐褪去(图 6)。诸葛菜染色

体上的 *PAP2* 基因在油菜花瓣中异位表达, 产生了开红花的油菜^[28](图 6)。MAAL5 表现诸葛菜的基部多分枝性状, 没有明显的主花序。MAAL6 开花比双亲都早, 明显比其他附加系矮小, 但没有明显的诸葛菜性状。MAAL7 的雌性完全败育, 而雄性正常可育。MAAL8 苗期植株的叶片向上卷曲。MAAL9 叶片颜色较浅, 但浅色叶片性状表现不稳定。

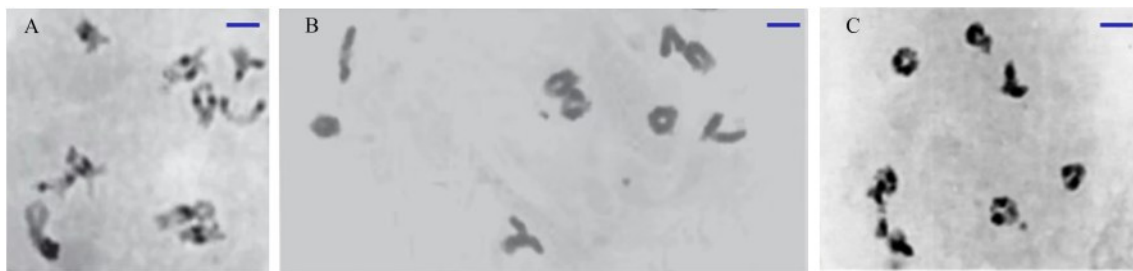


A: 白菜与诸葛菜属间杂种的减数分裂后期 I 花粉母细胞, 具有一些体积较大与染色深的染色体(箭头)^[20]。B~D: 芥菜型油菜与诸葛菜属间杂种的花粉母细胞^[19]。B: 中期 I, 一些体积较大与染色深的染色体处于落后状态(箭头)。C: 中期 I-后期 I, 一些体积较大与染色深的二价体的两条染色体仍未分开(箭头), 而其他体积较小的二价体的两条染色体多数已经分开。D: 后期 I, 两极的染色体在大小及染色深浅上仍有差异, 一些体积较大与染色深的染色体落后(箭头)

A: One pollen mother cell (PMC) at anaphase I in the hybrids between *B. rapa* L. and *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz, with some larger and darker chromosomes (arrows)^[20]. B-D: PMCs in the hybrids between *B. juncea* (L.) Czern. and *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz^[19]. B: Metaphase I, some larger and darker chromosomes being lagged or not. C: Metaphase I-anaphase I, the two chromosomes of some larger bivalents still associated, but those of the smaller bivalents are separated. D: Anaphase I, the chromosomes in two polar groups present the differences in size and staining, and some larger and darker chromosomes are lagged

图 4 白菜、芥菜型油菜与诸葛菜属间杂种的细胞学

Fig.4 Cytology of the intergeneric hybrids between *B. rapa* L., *B. juncea* (L.) Czern. and *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz



A: 白菜的 10 个二价体^[25], 每个二价体的不同部位在凝缩及染色上有差异, 一般在异染色质的着丝粒区域染色较深。B: 甘蓝的 9 个二价体^[25], 染色体基本上染色均匀。C: 黑芥的 8 个二价体^[26], 每个二价体一般在着丝粒区域染色较深。标尺: 5 μm

A: Ten bivalents in *B. rapa* L.^[25]. Differential condensation and staining appear on each bivalent, and the heterochromatic pericentric regions are heavily stained. B: Nine bivalents in *B. oleracea* L.^[25]. The chromosomes are generally homogenously stained. C: Eight bivalents in *B. nigra* (L.) W. D. J. Koch^[26]. Differential condensation and staining appear on each bivalent, and the heavily stained regions are dominant. Bar: 5 μm

图 5 芸苔属 3 个二倍体种的终变期染色体特征

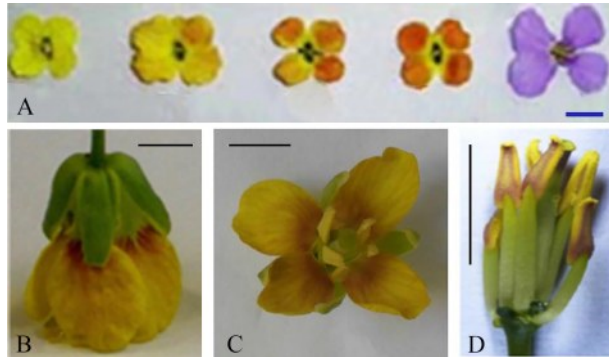
Fig.5 Diakinesis chromosomes in three *Brassica* L. diploids

诸葛菜的锯齿叶、基部多分枝、紫花这几个性状, 在与芸苔属栽培种的杂种中均得以表现, 为显性性状^[10, 14-15, 19-21, 29-30]。诸葛菜与白花芥兰^[21]、黄花结球甘蓝^[20]的预期杂种产生的花瓣均是白色背景上的紫色, 紫色比诸葛菜的淡, 结球甘蓝花瓣的黄色被抑制。具有甘蓝型油菜和诸葛菜双亲全部染色体的体细胞杂种的花瓣则是在黄色的背景上表

现一定的红色, 因紫色与红色混合后为红色^[10]。可见, 虽然控制紫花性状的主要基因在 1 条诸葛菜染色体上(MAAL4 附加的染色体), 但芸苔属基因组类型及组合影响其表达。

附加系 MAAL4~MAAL6 中的诸葛菜染色体载有 45S rDNA 位点、且都形成随体, 表明这些 rDNA 位点在甘蓝型油菜背景中有活性^[12]。在这 3 个附

加系中都检测出诸葛菜 rRNA 基因的转录,且在 MAAL4 中没有来自甘蓝型油菜的 rRNA 基因表达,说明诸葛菜的 rRNA 基因对甘蓝型油菜的为完全显性;而在 MAAL5 和 MAAL6 中同时还有甘蓝型油菜的 rRNA 基因表达,诸葛菜的为部分显性。



A: 诸葛菜与甘蓝型油菜及其体细胞杂种的花及花色。左一为甘蓝型油菜的黄花,右一为诸葛菜的紫花,中间三朵为体细胞杂种的花,具有不同程度的红色^[10]。B: 二体附加系 DAAL4 的淡花色花。C-D: 转诸葛菜 *PAP2* 基因的甘蓝型油菜的淡红色花及花药^[28]。

标尺:1 cm

A: Flowers and the color of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz, *B. napus* L. and their somatic hybrids^[10]. The left flower is the yellow flower of *B. napus* L.^[10]. The right one is the purple flower of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz. The middle three are the flowers of the hybrids with different extents of the red color. B: The flower of the disomics with slightly red color. C-D: The slightly red flower and anthers of transgenic *B. napus* L. plant with the *OvPAP2* gene^[28]. Bar: 1 cm

图6 诸葛菜的紫花色及遗传特征

Fig.6 Purple flower color of *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz, and its inheritance

4 诸葛菜的双羟基脂肪酸

较早的研究只是发现诸葛菜的种子油中亚油酸含量较高(约50%)、芥酸含量低(约1%),为油菜脂肪酸组成改良的低芥酸新资源^[7, 31]。几年前偶然发现诸葛菜种子油中还富含两种24碳的双羟基脂肪酸^[32],大约占总脂肪酸的38%,羟基在7和18碳原子上,命名为内布拉斯加脂肪酸(Nebraskanic acids, 7, 18-(OH)₂-24:1^{Δ15})和武汉脂肪酸(Wuhanic acids, 7, 18-(OH)₂-24:1^{Δ15, 21}),后者在C21位多了1个双键。双羟基脂肪酸C18处的羟基主要是在经典的 *FAD2* 型羟基化酶催化下完成, C7 位的羟基是在脂肪酸延伸过程中, 1 个功能发生分化的 *FAE1* 酶作用下通过“不连续延伸”形成的, 即 18 碳的羟基脂肪酸延伸产生的 20 碳中间产物在没有进行脱水反应的情况下直接进入了下一轮的延伸, 形成了 C5 羟基脂肪酸, 再经过一轮正常脂肪酸延伸而形成 C7 羟基

脂肪酸。研究表明,在 25 °C 常温及 100 °C 高温条件下诸葛菜油的润滑效果比蓖麻油更好,故诸葛菜油可作为耐高温的植物基润滑油开发。

在上述的 MAAL1 甘蓝型油菜-诸葛菜附加系中,也检测出低含量的羟基脂肪酸,表明这条染色体上载有羟基脂肪酸合成的相关基因,且在甘蓝型油菜背景中表达。

5 总结与展望

诸葛菜具有广泛的生态适应性^[33]、观赏性好的紫花、工业价值高的羟基脂肪酸,同时基因组具有同源多倍性、染色体易于识别等特点,细胞和组织再生能力强^[10, 15, 34-36],为开发利用和遗传研究的优异资源,还具有潜在的药用价值,其种子提取物具有细胞保护和护肝作用^[37-38]。鉴于诸葛菜在十字花科中的独特进化关系(原产于中国、系统演化上与其他物种没有明显的关系),已完成的基因组测序可深度解析其基因组结构及演化方式、羟基脂肪酸合成的候选基因^[17-18]。两个非整倍体类型/物种铺散诸葛菜、湖北诸葛菜(2n=20, 22)的基因组结构解析可进一步认识诸葛菜复合群的进化模式。

参考文献

- [1] 周太炎, 美克俭, 郭荣麟. 中国植物志(第33卷). 北京: 科学出版社, 1987: 40-43
Zhou T Y, Guan K J, Guo R L. Flora of China (Vol 33). Beijing: Science Press, 1987: 40-43
- [2] Couvreur L P, Franzke A, Al-Shehbaz I A, Bakker F T, Koch M A, Mummenhoff K. Molecular phylogenetics, temporal diversification, and principles of evolution in the mustard family (*Brassicaceae*). *Molecular Biology and Evolution*, 2010, 27: 55-71
- [3] Zhou L R, Liu Z B, Wu J, Wang J M, Yang Y, Li X F. Karyotype variation and evolution in populations of the Chinese endemic *Orychophragmus violaceus* complex (*Brassicaceae*). *Nordic Journal of Botany*, 2008, 26: 375-383
- [4] 周丽蓉, 余研, 宋荣秀, 何兴金, 蒋彦, 李旭峰, 杨毅. 中国特有诸葛菜复合群的系统发育关系. *云南植物研究*, 2009, 31(2): 127-137
Zhou L R, Yu Y, Song R X, He X J, Jiang Y, Li X F, Yang Y. Phylogenetic relationships within the *Orychophragmus violaceus* complex (*Brassicaceae*) endemic to China. *Acta Botanica Yunnanica*, 2009, 31(2): 127-137
- [5] Hu H, Al-Shehbaz I A, Sun Y S, Hao G Q, Wang Q, Liu J Q. Species delimitation in *Orychophragmus* (*Brassicaceae*) based on chloroplast and nuclear DNA barcodes. *Taxon*, 2015, 64: 714-726
- [6] 谭仲明, 许介眉, 赵炳祥, 张小亮. 诸葛菜属(十字花科)新分

- 类群. 植物分类学报, 1998, 36(6): 544-548
- Tan Z M, Xu J M, Zhao B X, Zhang X L. New taxa of *Orychophragmus* (Cruciferae) from China. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1998, 36(6): 544-548
- [7] 罗鹏, 兰泽莲, 黄建, 李再云. 珍贵油料植物诸葛菜的研究. 自然资源学报, 1991, 6(3): 206-210
- Luo P, Lan Z Q, Huang J, Li Z Y. Study on valuable plant resource *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz. Journal of Natural Resources, 1991, 6(3): 206-210
- [8] 李子先, 曹熙德, 刘东旭, 刘俊, 张作仕, 贾勇炯. 中国种诸葛菜变种群的核型研究. 作物学报, 1994, 20(5): 595-600
- Li Z X, Cao X D, Liu D X, Liu J, Zhang Z S, Jia Y J. A study on the karyotype of some Chinese variants of Zhuge Cai, *Orychophragmus violaceus*. Acta Agronomica Sinica, 1994, 20(5): 595-600
- [9] Hua Y W, Liu M, Li Z Y. Parental genome separation and elimination of cells and chromosomes revealed by GISH and AFLP analysis in intergeneric hybrids between *Brassica carinata* and *Orychophragmus violaceus*. Annals of Botany, 2006, 97: 993-998
- [10] Zhao Z G, Hu T T, Ge X H, Du X Z, Ding L, Li Z Y. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Brassica nausa* and *Orychophragmus violaceus* and their backcrossing progenies. Plant Cell Reports, 2008, 27: 1611-1621
- [11] Li Z Y, Cartagena J, Kukui K. Simultaneous detection of 45s and 5s rDNA genes in *Orychophragmus violaceus* by double fluorescence *in situ* hybridization. Cytologia, 2005, 70: 459-466
- [12] Ding L, Zhao Z G, Ge X H, Li Z Y. Intergeneric addition and substitution of *Brassica napus* with different chromosomes from *Orychophragmus violaceus*: Phenotype and cytology. Scientia Horticulturae, 2013, 164: 303-309
- [13] 李再云, 刘后利. 诸葛菜染色体的减数分裂配对研究. 华中农业大学学报: 自然科学版, 1995, 14(5): 435-439
- Li Z Y, Liu H L. A study on meiotic pairings in *Orychophragmus violaceus*. Journal of Huazhong Agricultural University: Natural Science Edition, 1995, 14(5): 435-439
- [14] Li Z Y, Liu H L, Luo P. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus*. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91: 131-136
- [15] 殷家明, 钟荣祺, 林呐, 唐章林, 李加纳. 诸葛菜小孢子培养及其单倍体减数分裂染色体配对观察. 作物学报, 2020, 46(2): 194-203
- Yin J M, Zhong R Q, Lin N, Tang Z L, Li J N. Microspore culture and observations on meiotic chromosome pairing of the haploid *Orychophragmus violaceus*. Acta Agronomica Sinica, 2020, 46(2): 194-203
- [16] Lysak M A, Cheung K, Kitchik M, Bureš P. Ancestral chromosomal blocks are triplicated in *Brassicaceae* species with varying chromosome number and genome size. Plant Physiology, 2007, 145: 402-410
- [17] Zhang C Y, Huang F, Chen P, Tang X Y, Zhong T, Yang T H, Nwafor C C, Yang C, Ge X H, An H, Li Z Y, Cahoon E B. Genome assembly of the *Brassicaceae* diploid *Orychophragmus violaceus* reveals complex whole genome duplication and evolution of dihydroxy fatty acid metabolism. Plant Communications, 2022, 3: 10432
- [18] Zhang K, Yang Y Q, Zhang X, Zhang L K, Fu Y, Guo Z W, Chen S M, Wu J, Schnable J C, Yi K K, Wang X W, Cheng F. The genome of *Orychophragmus violaceus* provides genomic insights into the evolution of *Brassicaceae* polyploidization and its distinct traits. Plant Communications, 2022, 3: 10431
- [19] Li Z Y, Wu J G, Liu Y, Liu H L, Heneen W K. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica juncea* × *Orychophragmus violaceus* and *B. carinata* × *O. violaceus*. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96: 251-265
- [20] Li Z Y, Heneen W K. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between the three cultivated *Brassica* diploids and *Orychophragmus violaceus*. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99: 694-704
- [21] 殷家明, 罗鹏, 蓝泽莲, 黄邦全. 芥蓝×诸葛菜属间杂种的获得. 园艺学报, 1998, 25(3): 297-299
- Yin J M, Luo P, Lan Z Q, Huang B Q. Production of intergeneric hybrids from *Brassica alboglabra* × *Orychophragmus violaceus*. Acta Horticulturae Sinica, 1998, 25(3): 297-299
- [22] 李再云, 刘焰. 芸苔属与诸葛菜属间杂种的细胞遗传学. 自然科学进展, 2002, 12(1): 8-12
- Li Z Y, Liu Y. Cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica species* and *Orychophragmus violaceus*. Progresses in Natural Sciences, 2002, 12(1): 8-12
- [23] Li Z Y, Ge X G. Unique chromosome behavior and genetic control in *Brassica* × *Orychophragmus* wide hybrids: A review. Plant Cell Reports, 2007, 26: 701-710
- [24] Fukui K, Nakayama S, Ohmido N, Yoshiaki H, Yamabe M. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96: 325-330
- [25] Heneen W K, Geleta M, Brismar K, Xiong Z Y, Pires J C, Hasterok R, Stoute A I, Scott R J, King G J, Kurup S. Seed colour loci, homoeology and linkage groups of the C genome chromosomes revealed in *Brassica rapa*-*B. oleracea* monosomic alien addition lines. Annals of Botany, 2012, 109: 1227-1242
- [26] Maćkowiak M, Heneen W K. Meiotic karyotypes of the B genomes of *Brassica nigra* and *B. carinata*. Hereditas, 1999, 130: 131-135
- [27] Heneen W K, Chen B Y, Cheng B F, Jonsson A, Simonsen V, Jørgensen R B, Davik J. Characterization of the A and C genomes of *Brassica campestris* and *B. alboglabra*. Hereditas, 1995, 123: 251-267
- [28] Fu W Q, Chen D Z, Pan Q, Li F F, Zhao Z G, Ge X H, Li Z Y. Production of red-flowered oilseed rape via the ectopic expression of *Orychophragmus violaceus* *OvPAP2*. Plant

- Biotechnology Journal, 2018, 16: 367-380
- [29] 邵玉娇, 曾攀, 李再云. 芸薹属种间和属间杂种和异源多倍体的偏亲表型及遗传机制. 植物遗传资源学报, 2021, 22(6): 1474-1482
- Shao Y J, Zeng P, Li Z Y. Phenotypic bias and genetic mechanisms in interspecific / intergeneric hybrids and allopolyploids of *Brassica*. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(6): 1474-1482
- [30] 李再云. 芸薹属作物的渗入杂交与种质资源创新. 植物遗传资源学报, 2020, 21(1):20-25
- Li Z Y. Introgressive hybridization and germplasm innovation in *Brassica* Crops. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(1):20-25
- [31] Luo P, Lan Z Q, Li Z Y. *Orychophragmus violaceus*, a potential edible-oil crop. Plant Breeding, 1994, 113: 83-85
- [32] Li X J, Teitgen A M, Shirani A, Ling J, Busta L, Cahoon R E, Zhang W, Li Z Y, Chapman K D, Berman D, Zhang C Y, Minto R E, Cahoon E B. Discontinuous fatty acid elongation yields hydroxylated seed oil with improved function. Nature Plants, 2018, 4: 711-720
- [33] 吴沿友, 刘丛强, 王世杰. 诸葛菜的喀斯特适生性研究. 贵阳: 贵州科技出版社, 2004: 1-154
- Wu Y Y, Liu C Q, Wang S J. Studies on the Carst landform adaptations of *Orychophragmus violaceus*. Guiyang: Guizhou Press of Science and Technology, 2004: 1-154
- [34] 徐晓昕, 许智宏. 诸葛菜组织培养中的器官形成. 实验生物学报, 1987, 20(4): 503-507
- Xu X X, Xu Z H. Organogenesis in tissue culture of *Orychophragmus violaceus*. Acta Biologica Experimentalis Sinica, 1987, 20(4):503-507
- [35] 徐晓昕, 许智宏. 诸葛菜叶肉原生质体培养再生植株. 植物生理学报, 1988, 14(1): 170-174
- Xu X X, Xu Z H. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Orychophragmus violaceus*. Acta Phytophysiologia Sinica, 1988, 14(1): 170-174
- [36] 张雪梅, 罗鹏. 诸葛菜外植体直接体细胞胚胎发生的研究. 四川大学学报: 自然科学版, 1995, 32(5): 587-593
- Zhang X M, Luo P. Direct somatic embryogenesis from the explants of *Orychophragmus violaceus*. Journal of Sichuan University: Natural Science Edition, 1995, 32(5): 587-593
- [37] Zhu N L, Wu H F, Xu Z Q, Liu C Q, Tian Y, Hu M G, Sun Z H, Li P F, Ma G X, Xu X D. New alkaloids with unusual spermidine moieties from the seeds of *Orychophragmus violaceus* and their cytoprotective properties. RSC Advances, 2017, 7: 41495-41498
- [38] Huo X W, Liu C Q, Gao L, Xu X D, Zhu N L, Cao L. Hepatoprotective effect of aqueous extract from the seeds of *Orychophragmus violaceus* against liver injury in mice and HepG2 cells. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18: 1197-1212