

埃塞俄比亚芥与芥蓝杂交获得异源三倍体及其细胞学研究

罗双霞, 张成合, 陈雪平, 申二巧, 申书兴

(河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

摘要:以埃塞俄比亚芥($2n = 4x = BBCC = 34$)和芥蓝($2n = 2x = CC = 18$)为材料,通过相互杂交获得了异源三倍体($2n = 3x = BCC = 26$)。该异源三倍体生长势较强;叶色等介于双亲之间;株型、花型和花大小偏向于埃塞俄比亚芥;花色与芥蓝的相同,为白花。减数分裂观察表明:在终变期,一般形成9个二价体和8个单价体($9\text{II} + 8\text{I}$),且B、C两组染色体表现出一定程度的分群现象;中期I,CC基因组的9个二价体排列在赤道板上,而B组的8个单价体游离在赤道板周围;后期I分到两极的染色体以13/13和12/14占多数,偶见落后的染色体。该BCC异源三倍体的获得为创建CC+B染色体的异附加系和研究B、C基因组间的亲缘关系奠定了基础。

关键词:埃塞俄比亚芥;芥蓝;异源三倍体;减数分裂

Synthesis and Cytological Studies of Allotriploid Interspecies between *Brassica carinata* and Chinese Kale

LUO Shuang-xia, ZHANG Cheng-he, CHEN Xue-ping, SHEN Er-qiao, SHEN Shu-xing

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Abstract: The allotriploid interspecies (BCC) were obtained by reciprocal crosses between *Brassica carinata* ($2n = 4x = BBCC = 34$) and Chinese kale ($2n = 2x = CC = 18$). The interspecies displayed a stronger growth than that of parents and intermediated to the leaf color of their parents. The plant type, flower shape, and flower color tended to parent *B. Carinata* and the white flower color was the same as that of Chinese kale. Meiosis observation of the allotriploid showed that 9 bivalents and 8 univalents ($9\text{II} + 8\text{I}$) were formed at diakinesis stage and the two kind of chromosomes (B and C) tended to separate into two groups. At metaphase I stage, 9 bivalents of CC genome arranged on equatorial plane and 8 univalents of B genome distributed around the equatorial plane. While at anaphase I stage, the distributions of chromosomes with 13/13 or 12/14 were in the majority, including occasionally backward chromosomes. Obtaining of this allotriploid (BCC) provided an important material for production of CC + B alien addition lines and study of chromosome homology between B and C genomes.

Key words: *Brassica carinata*; Chinese kale; allotriploid; meiosis

异源三倍体是包含2个同源和1个异源染色体组或基因组的个体,通常由异源四倍体与二倍体亲本回交获得。异源三倍体高度不育,一般在生产栽培上没有直接的应用价值,但却是遗传研究的好材料,可用于创建异附加系、异代换系和异易位系等珍

贵遗传材料,也可用于研究基因的表达和不同基因组间的亲缘关系。芸薹属有A、B、C3个基本基因组,染色体基数分别为 $x = 10$ 、 $x = 8$ 和 $x = 9$ 。近年来,本课题组利用大白菜、结球甘蓝、菜薹和芥蓝等芸薹属蔬菜,人工合成了大白菜-结球甘蓝、菜薹-芥

收稿日期:2012-04-22 修回日期:2012-05-11 网络出版日期:2013-01-30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130130.1618.013.html>

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2009000543)

作者简介:罗双霞,硕士,讲师,研究方向为蔬菜生物技术与遗传育种。E-mail: yylsx@hebau.edu.cn

通信作者:张成合,教授。E-mail: zhangchenghe06@126.com

蓝的异源四倍体新材料,并通过与其二倍体亲本回交获得了大白菜-结球甘蓝(AAC)、结球甘蓝-大白菜(CCA)、菜薹-芥蓝(AAC)和芥蓝-菜薹(CCA)的异源三倍体^[1-4],进而通过回交筛选和遗传鉴定获得了系列或部分单体异附加系^[5-8],从而有力地促进了芸薹属蔬菜的基因定位、遗传改良及A-C基因组间亲缘关系的研究。然而相对于A-C基因组,A-B或B-C基因组间的人工杂交研究相对较少。B基因组中的基本二倍体种为黑芥,自然形成的基本异源四倍体种为芥菜型油菜(AABB)和埃塞俄比亚芥(BBCC)。温贵聚等^[9]用二倍体大白菜(AA)与野生黑芥(BB)杂交,合成了大白菜-黑芥的种间二倍体杂种($2n = AB = 18$)。本研究试图利用自然四倍体种埃塞俄比亚芥(BBCC)与二倍体栽培种芥蓝(CC)杂交直接获得异源三倍体(BCC),为选育芥蓝附加黑芥不同染色体的异附加系提供基础材料;并通过对其花粉母细胞(PMCs, pollen mother cells)染色体联会行为观察,进一步阐明B-C基因组间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为埃塞俄比亚芥(*Brassica carinata*)和芥蓝(*Brassica alboglabra* Bailey),均由河北农业大学园艺学院遗传育种室提供。埃塞俄比亚芥为自然的异源四倍体种($2n = 4x = BBCC = 34$),开黄花;芥蓝为二倍体栽培种白花芥蓝($2n = 2x = CC = 18$),开白花。试验于2010-2012年在河北农业大学试验基地和园艺学院细胞学实验室进行。

1.2 方法

1.2.1 杂交授粉 于2010年12月底在日光温室播种,翌年2月定植,埃塞俄比亚芥和芥蓝各定植2行,每行10株,4-5月进行相互杂交。选取约2d后开花的花蕾人工去雄,用当天开花的新鲜花粉进行人工授粉,套袋隔离。成熟后统计坐果率和平均荚粒数。

1.2.2 杂交子代的染色体数目鉴定 2011年11月将杂交种子播入置铺有双层湿滤纸的培养皿中,

在光照培养箱中(23℃)培养,待子苗根长约1.0cm时,按单株切下根尖(约0.5cm)置0.002mol/L的8-羟基喹啉水溶液中预处理2h,然后用改良卡诺固定液(3份95%酒精:1份丙酸铁饱和液)固定;同时将切掉根尖的子苗移栽到装有1/2蛭石+1/2营养土的穴盘中,在光照培养箱中继续培养,并与其固定的根尖对应编号。根尖用于染色体数目鉴定,若根尖细胞被鉴定为三倍体($2n = 3x = 26$),则其移栽到穴盘中的对应子苗便保留并定植在日光温室中,用于形态学观察鉴定。

根尖染色体数目鉴定采用常规压片法,PIHCH(丙酸-铁-水合三氯乙醛-苏木精)染色液染色,Olympus BH-2光学显微镜观察和照相;形态学观察鉴定采用田间调查法,以双亲为对照,观测杂种植株的生长势、株高、株型、叶形、叶色、花形、花色等特征特性。

1.2.3 杂种植株的DNA相对含量测定 取幼嫩叶片,用美国Beckman-Coulter公司生产的Epics Altra流式细胞仪测定杂种及双亲的DNA相对含量。

1.2.4 杂种植株的减数分裂行为观察 于开花初期,选择适宜大小的花蕾用卡诺固定液(3份95%乙醇:1份冰醋酸)固定;常规压片法制片,PIHCH染色液染色,Olympus BH-2显微镜观察和照相。

1.2.5 杂种植株的结实性测定 以杂种植株(BCC)为母本,与二倍体芥蓝(CC)回交,测定结荚率和平均荚粒数。

1.2.6 回交子代的染色体数目鉴定 采用上述杂交子代染色体数目鉴定的方法对回交子代植株的染色体数目进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 埃塞俄比亚芥与芥蓝相互杂交的结实性比较

由表1可见,埃塞俄比亚芥(BBCC)与芥蓝(CC)相互杂交均有较高的结荚率,但荚内大都没有子粒,如CC×BBCC组合的87个荚均为空壳,BBCC×

表1 埃塞俄比亚芥与芥蓝相互杂交的结实性比较

Table 1 Comparison of cross fruitfulness between BBCC × CC and CC × BBCC combinations

杂交组合 Combinations	授粉花蕾数 Flower buds	结荚数 No. of pods	结荚率(%) Podding rate	总粒数 Total seeds	萌发成苗数 No. of seedlings
BBCC × CC	158	119	75.32	34	3
CC × BBCC	126	87	69.05	0	0

CC 组合的 119 个荚亦大部分为空壳,仅少数荚内存有一些发育程度不同的瘪子,共 34 粒。将这些瘪子经 70% 酒精消毒、冲洗后,置铺双层湿滤纸的培养皿中在光照培养箱中培养,结果仅有 3 粒萌发成苗。这表明,埃塞俄比亚芥与芥蓝存在着高度杂交不稔性。

2.2 三倍体杂种植株的 DNA 相对含量

利用流式细胞仪对叶片细胞的 DNA 相对含量

进行了分析。结果显示,亲本二倍体芥蓝和四倍体埃塞俄比亚芥的 DNA 峰值分别出现在横坐标的 2 和 4 位置上(图 1A、图 1C),而三倍体杂种植株的 DNA 峰值则介于双亲之间,出现在 3 位置上(图 1B),亦即三倍体杂种细胞的 DNA 相对含量是二倍体亲本的 1.5 倍、四倍体亲本的 3/4,从而进一步证实该杂种植株为真实的异源三倍体(BCC)。

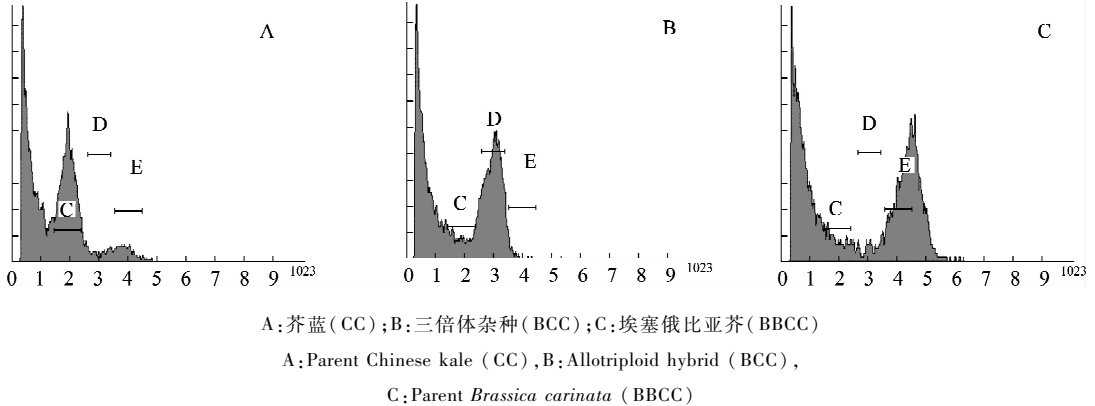


图 1 三倍体杂种及其双亲叶片细胞的 DNA 相对含量

Fig. 1 DNA relative content in leaf cells of allotriploid and parents

2.3 埃塞俄比亚芥与芥蓝杂交子代的染色体数目

对萌发的 3 粒种子分别进行了染色体数目鉴定。结果表明,其中 2 粒种子的染色体数为 $2n = 4x = 34$ (图 2G),与亲本埃塞俄比亚芥的相同,可能是杂交授粉过程中隔离不严密发生自交的结果;另 1 粒种子的染色体数为 $2n = 3x = 26$ (图 2H),为真实的异源三倍体($2n = 3x = BCC = 8 + 9 + 9 = 26$)。为保留和利用该三倍体材料,采用腋芽离体培养方法将其繁殖成试管无性系。

2.4 三倍体植株的特征特性

观测表明,三倍体杂种植株表现出明显的双亲特征(图 2、表 2),如叶色为暗绿色,介于双亲埃塞俄比亚芥(浅绿色)和芥蓝(灰绿色)之间(图 2A、B、C);株型、叶形趋向于亲本埃塞俄比亚芥(图 2A、B);尤为明显的是杂种植株的花形和花冠大小与亲本埃塞俄比亚芥的相似,但花色却与亲本芥蓝的相同,均开白花(图 2E、F),而埃塞俄比亚芥开黄花(图 2D)。

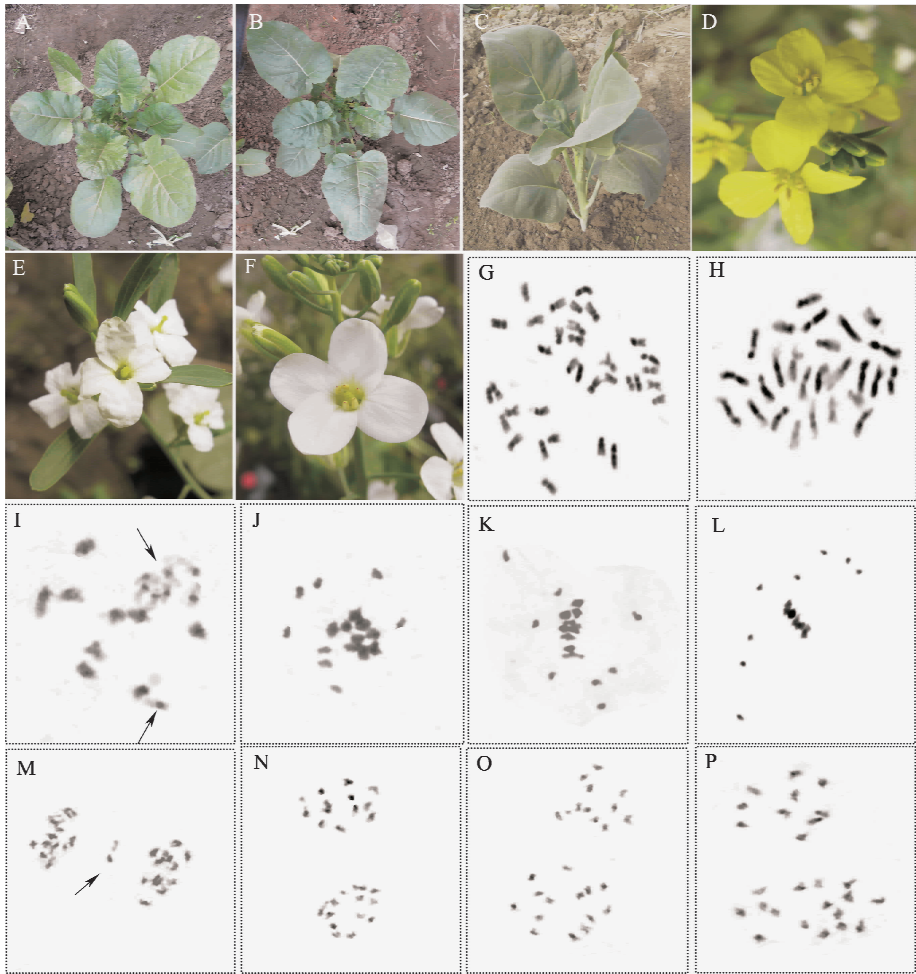
2.5 三倍体的减数分裂行为

对该三倍体(BCC)花粉母细胞的减数分裂行为进行了观察。结果显示,该三倍体在终变期一般形成 9 个二价体和 8 个单价体,且表现出一定程度的分群现象,即 CC 基因组的 9 个二价体常常分布在一个区域,B 基因组的 8 个单价体分布在另一个

区域(图 2I),在观察的 30 多个 PMCs 中未见 B 组单价体与 CC 组二价体发生同源联会的现象,这表明 B 基因组和 C 基因组的亲缘关系是相对较远的;中期 I,CC 组的 9 个二价体排列在赤道板上,而 B 组的 8 个单价体则一般游离在赤道板的周围(图 2J-L);后期 I,9 个二价体正常分离,8 个单价体则随机向两极游离,偶见个别落后的单价体(图 2M)。由表 3 可见,后期 I 分到两极的染色体数大多为 13/13 和 14/12(图 2N-O),16/10 分离的(图 2P)约占 2.86%。16/10 分离是产生 $n+1$ 配子(包含 C 组 9 个染色体和 B 组 1 个染色体)、进而从其回交子代中直接筛选单体异附加系的基础。

2.6 三倍体与二倍体芥蓝回交子代的染色体数目鉴定

该异源三倍体(BCC)雌蕊发育正常,但花药基本退化,无花粉。因此以三倍体作母本与二倍体芥蓝(CC)进行了回交。结果表明,结荚率为 62.65%,但结子率较低,平均荚粒数仅为 1.43 粒。为明确从其回交子代中直接筛选单体异附加系的效率,对回交子代植株的染色体数目分别进行鉴定。由表 4 可见,在鉴定的 49 个子代植株中 $2n = 18$ 的整倍体植株最多,其次为附加 1~3 条染色体的非整倍体植株,附加 4 条及以上染色体的非整倍体植株



A: 亲本埃塞俄比亚芥 (BBCC) 植株; B: 三倍体杂种 (BCC) 植株; C: 亲本芥蓝 (CC) 植株; D: 亲本埃塞俄比亚芥 (BBCC) 的花, 黄花; E: 三倍体杂种 (BCC) 的花, 白花, 花药退化; F: 亲本芥蓝 (CC) 的花, 白花; G: 亲本 BBCC 的染色体数目, $2n = 4x = 34$; H: 三倍体杂种 BCC 的染色体数目, $2n = 3x = 26$; I: BCC 终变期, $9 \text{ II} + 8 \text{ I}$, 箭头示 B 基因组单价体; J~L: BCC 中期 I, $9 \text{ II} + 8 \text{ I}$; M: BCC 后期 I, 箭头示落后染色体; N: BCC 后期 I, $13/13$ 分离; O: BCC 后期 I, $12/14$ 分离; P: BCC 后期 I, $10/16$ 分离
A: *B. carinata* (BBCC) plant type, B: Allotriploid (BCC) plant type, C: Chinese kale (CC) plant type, D: *B. carinata* flower type and color, E: Allotriploid flower type and color, F: Chinese kale flower type and color, G: *B. carinata* chromosome number $2n = 4x = 34$, H: Allotriploid chromosome number $2n = 3x = 26$, I: Allotriploid meiotic diakinesis, arrow showing B genome univalents, J~L: Allotriploid meiotic metaphase I, showing 9 bivalents and 8 univalents, M: Allotriploid meiotic anaphase I, arrow showing lagged chromosomes, N~P: Allotriploid meiotic anaphase I, showing $13/13$, $12/14$, and $10/16$ chromosome distribution, respectively

图 2 亲本与三倍体的植株特征与染色体数目

Fig. 2 Plant characteristics and chromosome numbers of the allotriploid and parents

表 2 三倍体杂种及其双亲植株形态特征比较

Table 2 Morphological characteristics comparison between the allotriploid and parents

材料 Materials	株高 (cm) Plant height	叶色 Leaf color	叶片大小 (cm) Leaf size	叶柄长 (cm) Petiole length	花色 Flower color	花冠大小 (cm) Coronal size
芥蓝 CC	124	灰绿	14.5 × 13.3	9.0	白花	24.8 × 18.3
杂种 BCC	163	暗绿, 边缘带紫色	29.7 × 25.4	21.3	白花	16.7 × 15.8
埃塞俄比亚芥 BBCC	183	浅绿, 边缘带紫色	16.4 × 12.5	15.7	黄花	19.6 × 17.9

表中数字为 5 株的平均值 Figures in the table are all average value of 5 plants

表 3 三倍体杂种后期 I 的染色体分离方式及频率

Table 3 Chromosome distribution of BCC at anaphase I

染色体分离方式 Chromosome distribution	17/9	16/10	15/11	14/12	13/13	其他 Others
细胞数 No. of cells	0	2	11	21	27	9
比率(%) Percentage	0	2.86	15.71	30.00	38.57	12.86

表 4 三倍体杂种与亲本芥蓝回交子代的染色体数目

Table 4 Chromosome numbers of progenies from the allotriploid backcrossing with parent Chinese kale

染色体数 No. of chromosomes	18	19	20	21	22	23	24	25	26
株数 No. of plants	16	13	9	7	3	1	0	0	0
比率(%) Percentage	32.65	26.53	18.37	14.29	6.12	2.04	0	0	0

仅占极少数。附加 1 条额外染色体的植株可直接用于单体异附加系的鉴定,而附加 2 条或 3 条额外染色体的植株则可与二倍体亲本芥蓝再次回交,以提高单体异附加系的选择效率。

3 讨论

获得异源三倍体的常规途径是通过种间杂交合成异源四倍体,然后再利用该异源四倍体与二倍体亲本回交。该方法简便有效,但常常会遇到种间杂交或倍性间杂交不稔的问题。本研究以自然异源四倍体埃塞俄比亚芥(BBCC)为基本材料,通过与二倍体芥蓝(CC)相互杂交创建异源三倍体(BCC),同样遇到杂交不稔的问题,在 BBCC × CC 组合的 119 个成熟荚中仅获得一些发育程度不同的瘪粒种子,而在 CC × BBCC 组合的 87 个成熟荚中则未得到任何种子。造成种间及倍性间杂交不稔的原因通常主要有两种,一是受精前的障碍,即花粉与柱头不亲和或花粉管不能正常生长或雌、雄配子不能正常受精融合;二是受精后的障碍,即胚乳提早退化引起合子或幼胚不能正常发育而早期夭亡。由于本研究中埃塞俄比亚芥与芥蓝相互杂交均有较高的结荚率,这表明授粉受精并不是引起其杂交不稔的主要障碍,而杂种幼胚早期败育可能是造成其杂交不稔的主要因素。本实验室对四倍体菜心与二倍体芥蓝杂交败育及四倍体甘蓝与二倍体甘蓝杂交败育的原因进行胚胎学观

察,结果都表明胚珠大多能完成受精过程,是由于胚乳提前解体致使幼胚饥饿而停止发育^[3,10]。

研究基因组间的同源异源性是探讨种间亲缘关系及系统演化关系的重要环节,也是利用染色体工程进行品种遗传改良的重要基础。分子原位杂交和基因组比较表明,芸薹属 A-C 基因组间的亲缘性相对较近,而 A-B 基因组间及 B-C 基因组间的亲缘关系相对较远^[11-15]。近年来,在大白菜-结球甘蓝种间三倍体(AAC)、菜薹-芥蓝种间三倍体(AAC)和芥蓝-菜薹种间三倍体(CCA)的减数分裂观察中都看到 A-C 染色体组间至少有 5~7 条染色体存在不同程度的同源性^[1-4],从而进一步证实 A-C 基因组间确实存在着较密切的同源性。本研究以自然异源四倍体埃塞俄比亚芥(BBCC)为材料,通过与芥蓝(CC)回交,人工合成了染色体组为 BCC 的异源三倍体,并对该异源三倍体的减数分裂行为进行了观察,看到 CC 基因组的 18 条染色体能正常联会成 9 个二价体,而 B 基因组的 8 条染色体在终变期或中期 I 均以单价体的形式存在,这表明 B、C 两基因组的染色体缺乏同源性,从而进一步证实了芸薹属 B、C 基因组间亲缘关系较远的论点。

异源三倍体是创建异附加系和异代换系的基础材料。在芸薹属植物中利用人工合成的异源三倍体已经创建出了野油菜-芥蓝^[16]、大白菜-结球甘蓝^[5]和菜薹-芥蓝等种间的单体异附加系^[6-8]。利用异源

三倍体回交途径选育单体异附加系,特别是获得系列单体异附加系的一个关键因素是异源三倍体与二倍体亲本回交的结子率,只有获得较多的回交种子才能够从中筛选出附加不同染色体的系列单体异附加系。然而,种间及异倍体间杂交常常存在杂交不亲和或杂种败育的问题。本研究中,虽然异源四倍体埃塞俄比亚芥与二倍体芥蓝杂交高度不稔,获得三倍体植株的机率较低,但在获得三倍体后即可通过腋芽离体培养途径繁殖成试管无性系,这样便可解决三倍体的保存和利用问题;另一方面利用该三倍体再与二倍体芥蓝回交,结子率有较大提高,且回交子代中 $2n+1$ 和 $2n+2$ 植株占较大比率,为通过回交途径筛选一套芥蓝(CC)附加 B 染色体的异附加系提供了可靠保障。

参考文献

- [1] 顾爱侠,申书兴,陈雪平,等. 大白菜与结球甘蓝杂交获得异源三倍体及其生殖特性的研究[J]. 园艺学报,2006,33(1): 73-77
- [2] 张巍巍,申书兴,王彦华,等. 结球甘蓝—大白菜异源三倍体小孢子培养的研究[J]. 园艺学报,2009,36(4): 583-586
- [3] 袁鹤,张成合,满红,等. $4x$ 菜心 $\times 2x$ 芥蓝的胚胎发育观察及离体培养获得三倍体[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(3): 297-301
- [4] 任艳蕊,乔雪华,张成合,等. 芥蓝-菜薹种间三倍体 CCA 的合成及细胞学研究[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(2): 230-235
- [5] 刘炜,申书兴,王彦华,等. 大白菜—结球甘蓝异附加系的获得与鉴定[J]. 园艺学报,2008,35(2): 207-212
- [6] Wang X E, Zhang C H, Xuan S X. Selection and identification of flowering Chinese cabbage-Chinese kale alien monosomic addition lines[J]. Agr Sci China, 2008, 7(6): 101-105
- [7] Shen E Q, Li X F, Zhang C H, et al. Generation and identification of four new monosomic addition lines of flowering Chinese cabbage-Chinese kale[J]. Front Agric China, 2011, 5(2): 215-220
- [8] 任艳蕊,张成合,申二巧,等. 芥蓝—菜薹种间三倍体回交子代染色体数鉴定及单体异附加系的选育[J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 213-220
- [9] 温贵聚,赵泓,郭仰东,等. 大白菜和黑芥种间杂种的获得及鉴定[J]. 华北农学报,2008,23(4): 105-109
- [10] 张成合,张书玲,申书兴,等. ‘青露’菜薹三倍体的获得及其胚胎学观察[J]. 园艺学报,2001,28(4): 317-322
- [11] Cheung W Y, Champagne G, Hubert N, et al. Comparison of the genetic maps of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 569-582
- [12] Snowdon R J, Kohler W, Kohler A. Genomic *in situ* hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1320-1324
- [13] Benabdelmouna A, Shi Y, Abiracheddarmency M. Genomic *in situ* hybridization (GISH) discriminates between the A and the B genomes in diploid and tetraploid *Setaria* species[J]. Genome, 2001, 44: 685-690
- [14] 粟茂腾,张椿雨,刘列钊,等. 芸薹属 A, B 和 C 基因组之间关系研究进展[J]. 遗传, 2005, 27(4): 671-676
- [15] Ge X H, Li Z Y. Intra-and intergenomic homology of B-genome chromosomes in trigonomic combinations of the cultivated *Brassica* species revealed by GISH analysis[J]. Chromosome Res, 2007, 15: 849-861
- [16] Chen B Y, Cheng B F, Jorgensen R B. Production and cytogenetics of *Brassica campestris*-*albuglabra* addition chromosome addition lines[J]. Theor Appl Genet, 1997, 84: 592-599