ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA 华北农学报·2008, 23(5): 89-92

大白菜-结球甘蓝2号单体、双体异附加系的获得与鉴定

王 娟, 桑 丹, 轩淑欣, 李晓峰, 王彦华, 申书兴

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘要: 以大白菜-结球甘蓝异源三倍体(AAC, 2n= 3x= 29)与二倍体大白菜(AA, 2n= 2x= 20)回交一代 BC_1F_1 及其自交后代 BC_1F_2 为试验材料, 经过细胞学观察和核型分析, 于 BC_1F_1 中鉴定出了附加甘蓝2号染色体的大白菜-结球甘蓝单体异附加系, 于 BC_1F_2 中鉴定出了附加甘蓝2号染色体的大白菜-结球甘蓝双体异附加系, 并对其进行了减数分裂与植株形态学观察。该异附加系的获得为分析大白菜和甘蓝的亲缘关系, 进一步获得大白菜和结球甘蓝易位系、代换系提供了基础材料。

关键词: 大白菜; 结球甘蓝; 异附加系

中图分类号: S634.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)05-0089-04

Creation and Identification of Monosomic Alien Addition Lines and Disomic Addition Lines 2# in Chinese Cabbage-Cabbage

WANG Juan, SANG Dan, XUAN Shu-xin, LI Xiao-feng, WANG Yan-hua, SHEN Shu-xing

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baodoing 071001, China)

Abstract: The backcross BC_1F_1 between allotripolid hybrids(AAC, 2n= 3x= 29) and Chinese cabbage(AA, 2n= 2x= 20) and self-fertilized progeny of it BC_1F_2 were used as materials in this study. A mosomic addition line named CO-2-1 (Chinese cabbage with chromosome 2 from cabbage) and a disomic addition line named CO-2-1D were obtained by cytological identification and karyotype analysis, and investigated the PMC meiosis behavior and the field character of the plants. The obtained alien addition lines would be used to analyzing the genetic relationship between Chinese cabbage and cabbage, and synthesizing their translocation lines and substitution lines.

Key words: Chinese cabbage; Cabbage; Alien addition line

异附加系是指一个或一对异源染色体附加到一个物种的染色体组上的品系。根据所附加外源染色体的数目, 可将异附加系分为单体、双体和多重异附加系。其中单体、双体异附加系的研究和利用价值较高。国内外遗传育种工作者在小麦异附加系的选育和鉴定研究方面做了大量的工作[1]。此外, 异附加系已在水稻[2]、烟草、甜菜[3]、番茄、马铃薯[4]等作物上成功合成, 并在遗传研究与品种改良上发挥了重要作用。大白菜(*Brassica compestris* ssp. *pekinensis*)与结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)同为十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica*)作物, 二者染色体组间具有较强的同源性[5]。前人在十字花科作物上通过种间杂交[6]和染色体的附加、重组、易位[7,8], 进行了新种质创建研究, 但未有大白菜与结球甘蓝异附加系创建的研究。本研究以大白菜-结球甘蓝异源三倍体(AAC, 2n= 3x= 29)与二倍体大白菜(AA, 2n= 2x= 20)回交一代及其自交后代为试材, 通过染色体数目鉴定和核型分析, 鉴定出了大白菜-结球甘蓝2号单体、双体异附加系, 为代换系、易位系的合成提供了重要基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为大白菜-结球甘蓝异源三倍体与二

收稿日期: 2008-05-26

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2005000222); 河北农业大学科技将帅计划

作者简介: 王 娟(1982-), 女, 河北青县人, 在读硕士, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。

通讯作者: 申书兴(1964-), 男, 河北唐山人, 博士, 教授, 主要从事蔬菜育种与生物技术方面的研究。

倍体大白菜回交一代 BC_1F_1 及其自交后代 BC_1F_2。以上供试材料均由河北农业大学园艺学院细胞生物学实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 染色体数目鉴定 将 BC_1F_1、BC_1F_2 种子接于 1/2 MS 培养基上生根培养, 根长至 0.5~ 1.0 cm 左右时切取根尖放入 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉中预处理 2 h, 转至卡诺氏液于 4℃固定 24 h, 再换至 70% 乙醇中 4℃保存备用。60℃条件下用 1 mol/L 盐酸解离 10 min, 丙酸-铁-水合三氯乙醛-苏木精染色, 压片镜检, 选取染色体分散、清晰的细胞进行染色体计数并显微照相。

1.2.2 附加染色体类型的鉴定 选取染色体分散良好且清晰的 5 个细胞, 获得早中期染色体形态图, 参照李懋学[9] 核型分析方法分析。

1.2.3 植株形态学观察 将经核型分析初步鉴定出的染色体数为 21, 22 条的单、双体异附加系植株接种到MS 培养基上继代扩繁, 而后转入 1/2 MS 培养基上生根培养, 待根长约 1.0 cm 左右时, 一部分经锻炼栽植入培养钵中过渡后种植到露地; 另一部分经过 20~ 25 d 0~ 4℃春化锻炼, 种植入培养钵中过渡后栽植到温室。对植株生长势、株高、分枝能力、叶形、叶色、叶表面特征、花色、抽薹早晚等进行调查。

1.2.4 花粉母细胞减数分裂观察 盛花期于 9:00 – 11:00 取植株幼小花序用卡诺氏液(酒精: 冰乙酸 = 3: 1) 固定 48 h 以上, 再换至 70% 乙醇中, 4℃冰箱中保存备用。取花粉母细胞处于减数分裂时期的花药, 丙酸-铁-水合三氯乙醛-苏木精法染色, 然后压片镜检观察花粉母细胞减数分裂过程的染色体行为。

2 结果与分析

2.1 附加结球甘蓝 **2** 号染色体的大白菜单体异附加系的获得与鉴定

对 BC_1 种子进行根尖染色体数目鉴定, 鉴定出 1 株染色体 2n= 21 的植株, 参照李懋学的核型分析方法进行分析。由核型图(图 1-A, B) 、核型参数(表 1) 以及与大白菜和结球甘蓝核型参数[10, 11] 比较可知, 该植株为附加了结球甘蓝 2 号染色体的大白菜单体异附加系植株, 暂定名为 CO-2-1。CO-2-1 的核型由 6 个中部着丝点染色体(第 1, 3, 5, 6, 8, 11 号) 、4 个近中部着丝点染色体(第 4, 7, 9, 10 号) 和 1 个近端部着丝点染色体组成。第 11 号染色体为附加单体染色体, 与其他染色体明显不同, 臂比值(1.23) 跟甘蓝的第 2 号染色体臂比值(1.21) [11] 相近。通过核型分析比较, 可确定 CO-2-1 为附加了甘蓝 2 号染色体的大白菜-结球甘蓝单体异附加系。

表 1 CO-2-1 体细胞中期染色体的核型参数

Tab. 1 Major characters of karyotype of CO-2-1 metaphase chromosomes

染色体序号 No. of chromosome	染色体相对长度/%(L+ S) Relative length	臂比值(L/S) Arm ratio	着丝点类型 Centromere type
1	8.05+ 6.00= 14.05	1.34	m
2	9.10+ 2.82= 11.92	3.22	st(SAT)
3	7.12+ 4.47= 11.60	1.59	m
4	7.10+ 3.95= 11.05	1.80	sm
5	5.32+ 4.50= 9.82	1.18	m
6	5.57+ 4.00= 9.57	1.39	m
7	5.70+ 3.20= 8.90	1.78	sm
8	5.10+ 3.30= 8.40	1.55	m
9	5.00+ 2.72= 7.72	1.83	sm
10	4.42+ 2.55= 6.97	1.74	sm
11	6.90+ 5.60= 12.50	1.23	m

注: SAT 为随体染色体, 其相对长度和臂比为不带随体计入数据; 下表同。

Note: "SAT" represent the satellite chromosome, and the figures of relative length and arm ratio didn't include the lengths of satellites; The same as follow.

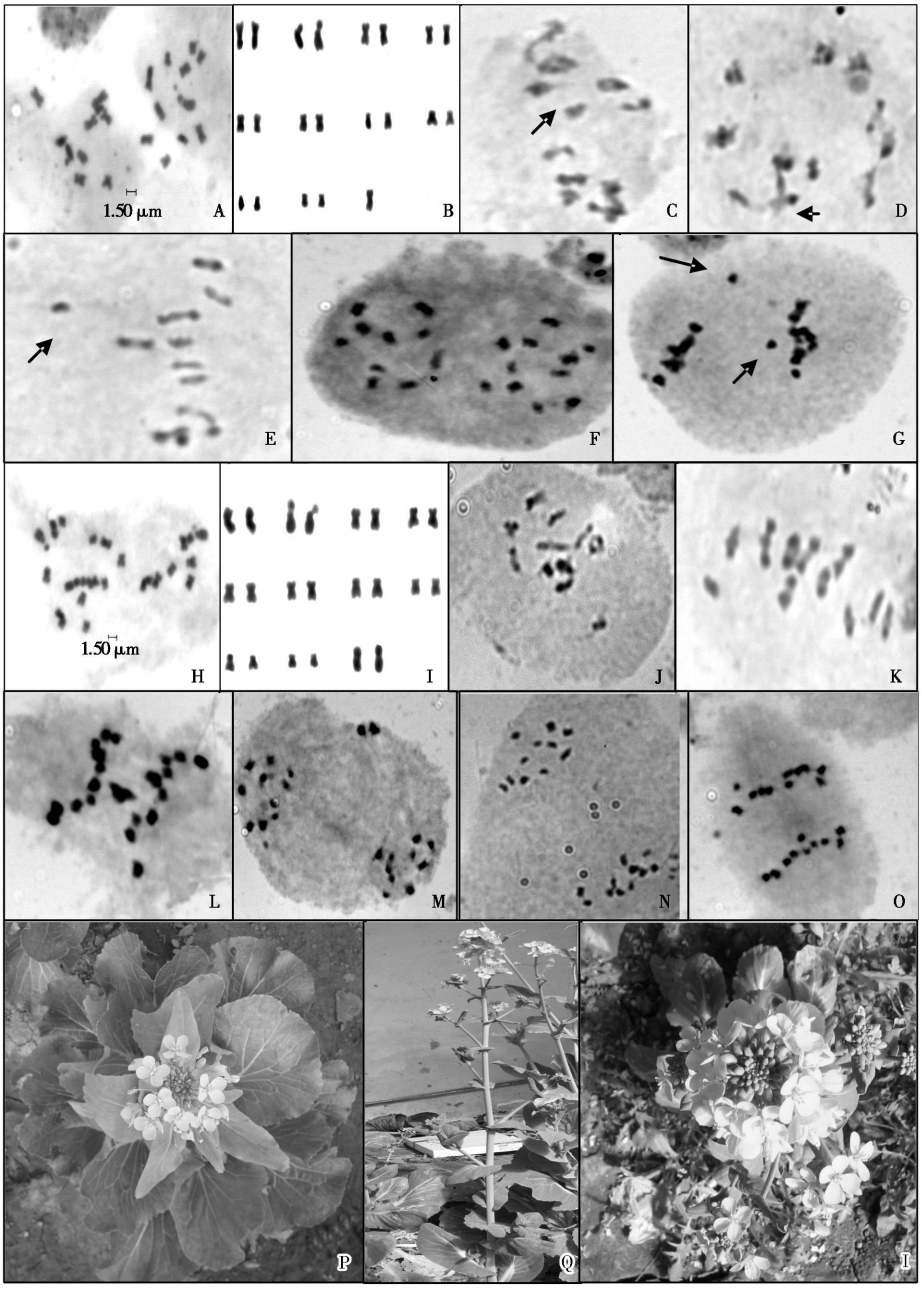
2.2 附加结球甘蓝 **2** 号染色体的大白菜双体异附加系的获得与鉴定

对 BC_1F_2 植株进行根尖有丝分裂观察, 鉴定出 3 株染色体 2n= 22 的植株, 参照李懋学的核型分析方法进行了分析, 其中一株为附加结球甘蓝双体染色体的植株。由核型图(图 1-H, I) 、核型参数(表 2) 以及与大白菜和结球甘蓝核型参数[10, 11] 比较可见, 该株为附加了结球甘蓝 2 号染色体双体的植株, 暂定名为 CO-2-1D。CO-2-1D 的核型由 6 个中部着丝点染色体(第 1, 3, 5, 6, 8, 11 号) 、4 个近中部着丝点染色体(第 4, 7, 9, 10 号) 和 1 个近端部着丝点染色体组成。第 11 号染色体为附加双体染色体, 臂比值 (1.33) 跟甘蓝的第 2 号染色体臂比值(1.26) [11] 相近。通过核型分析比较, 可确定 CO-2-1D 为附加了甘蓝 2 号染色体的大白菜-结球甘蓝双体异附加系。

表 2 CO-2-1D 体细胞中期染色体的核型参数

Tab. 2 Major characters of karyotype of CO-2-1D metaphase chromosomes

染色体序号 No. of chromosome	染色体相对长度/%(L+ S) Relative length	臂比值(L/S) Arm ratio	着丝点类型 Centromere type
1	7.48+ 5.56= 13.04	1.34	m
2	8.75+ 2.67= 11.42	3.28	st(SAT)
3	6.71+ 4.48= 11.19	1.50	m
4	6.75+ 3.75= 10.50	1.80	sm
5	5.61+ 4.75= 10.36	1.18	m
6	5.77+ 4.29= 10.06	1.34	m
7	6.19+ 2.88= 9.07	2.15	sm
8	5.52+ 3.31= 8.83	1.67	m
9	5.40+ 2.81= 8.21	1.92	sm
10	4.63+ 2.69= 7.32	1.72	sm
11	6.94+ 5.23= 12.17	1.33	m



A, B. CO-2-1 核型, 2n= 21; C. CO-2-1 终变期, 10 II+ I(箭头所示); D. CO-2-1 终变期, 9 II+ III(箭头所示); E. CO-2-1 中期iv, 单个染色体游离于赤道板外(箭头所示); F. CO-2-1 后期iv, 染色体 11/10 方式分离; G. CO-2-1 中期㊢, 染色体排列于赤道板单个染色体游离于赤道板外(箭头所示); H, I. CO-2-1D 核型, 2n= 22; J. CO-2-1D 终变期, 11㊢; K. CO-2-1D 中期iv, 染色体排列于赤道板; L, M. CO-2-1D 后期iv, 一对染色体分离落后; N. CO-2-1D 后期iv, 染色体 11/11 方式分离; O. CO-2-1D 中期㊢, 染色体排列于赤道板; P. CO-2-1 田间形态; Q, R. CO-2-1D 田间形态。

A, B. CO-2-1 karyotype; C. CO-2-1 diakinesis, 10 II+ I(the arrow showed); D. CO-2-1 diakinesis, 9 II+ III(the arrow showed); E. CO-2-1 metaphase iv, the lone chromosome free move to cytoplasm(the arrow showed); F. CO-2-1 anaphase iv, chromosomes distribution with 11/10; G. CO-2-1 metaphase㊢, chromosomes move equator plank the lone chromosome free move to cytoplasm(the arrow showed); H, I. CO-2-1D karyotype; J. CO-2-1D diakinesis, 11㊢; K. CO-2-1D metaphase iv, chromosomes move to equator plank; L, M. CO-2-1D anaphase iv, two chromosomes lag in the process of separating; N. CO-2-1D anaphase iv, chromosomes distribution with 11/11; O. CO-2-1D metaphase㊢, chromosomes move to equator plank; P. CO-2-1 morphometrics; Q, R. CO-2-1D morphometrics.

图 1　**CO-2-1 和 CO-2-1D 核型、减数分裂及田间性状**

Fig. 1　Karyotype, meiosis and field traits of CO-2-1 and CO-2-1D

2.3　异附加系植株形态学观察

CO-2-1 株系与亲本大白菜相比, 叶片颜色较深, 叶片表面光滑无褶皱, 叶背面有轻微蜡粉, 株型较为直立, 分枝能力较差, 不包心, 抽薹较早, 花器大, 花序蕾数多, 花粉少, 结籽率低。CO-2-1D 株系与亲本大白菜相比, 叶片颜色呈蓝绿色, 叶片较小, 呈卵圆状, 叶面光滑无褶皱, 主叶脉明显, 叶背面有轻微蜡粉, 株型直立, 分枝能力极差, 不包心, 抽薹较晚, 花器大, 花序蕾数多, 花粉少, 结籽率低。

2.4　异附加系植株花粉母细胞减数分裂观察

对 CO-2-1 植株进行花粉母细胞减数分裂观察, 在减数分裂终变期主要以 10 个二价体和 1 个单价

体(10II+ I)的联会形式存在(图1-C),少数以9个二价体和1个三价体(9II+ III)的联会形式存在(图1-D)。中期I、II单价体游离于赤道板外(图1-E, G),后期iv以11∶10方式分离(图1-F)。

对CO-2-1D植株进行花粉母细胞减数分裂观察,在减数分裂终变期主要以11个二价体的联会形式存在(图1-J)。中期iv染色体均匀排列于赤道板上(图1-K),但其中一对染色体在分离过程中出现落后现象(图1-L),所以后期iv染色体多以10∶2∶10的方式分离(图1-M),少数以11∶11的方式分离(图1-N)。中期II染色体排列于赤道板两侧(图1-O)。

3 讨论

单体异附加系CO-2-1在减数分裂的终变期,染色体多以10个二价体和1个单价体(10 II+ I)的联会形式存在,少数以9个二价体和1个三价体(9 II+ III)的联会形式存在,中期iv有染色体游离于赤道板外,说明附加甘蓝2号染色体与大白菜染色体同源性较低[12]。在田间性状方面,与亲本大白菜相比,CO-2-1和CO-2-1D株系叶片颜色较深,叶面有腊质,叶片表面光滑无褶皱,株型直立,花器大,花序蕾数多等特点都接近于亲本甘蓝,说明CO-2-1和CO-2-1D中存在甘蓝染色体。本研究中异附加系的鉴定选用的是核型分析方法,这种方法简单、方便,选取体细胞分裂中期分散性良好且着丝点清晰的染色体观察染色体形态,但由于大白菜属于小型染色体物种,并且多数染色体为中部着丝点和近中部着丝点类型,要准确鉴定和区分不同染色体,就要有高质量的染色体制片。目前,最准确的方法是利用分子标记或荧光原位杂交技术[13],因此,细胞学研究只能作为异附加系的初步鉴定。

参考文献:

[1] 丁 斌,王洪刚,孙海燕,等.小麦—中间偃麦草双体异附加系的鉴定[J].西北植物学报,2003,23(11):1910-1915.

[2] Yasui H, Iwata N. Production of monosomic alien addition lines of *Oraya sativa* having a single *O. punctata* chromosome[J]. Rice Genetics ㊀, 1991: 147-155.

[3] 高东杰,康传红,刘丽萍,等.栽培甜菜染色体的单体附加系列[J].中国糖料,2001(4):5-9.

[4] Jacobsen E, De Gong J H, Kamstra S A, *et al*. Genomic in situ hybridization(GISH) and RFLP analysis for the identification of alien chromosomes in the backcross progeny of potato (+) tomato fusion hybrids[J]. Heredity, 1995, 74: 250-257.

[5] 李宗芸,栗茂腾,黄荣桂,等.基因组原位杂交辨别芸薹属异源四倍体AA、BB、CC基因组研究[J].中国油料作物学报,2002,24(1):10-14.

[6] 黄邦全,刘幼琪,吴文华,等.Qgura CMS紫菜薹×萝卜×甘蓝型油菜杂种的获得及细胞遗传不研究[J].遗传学报,2002,29(5):467-470.

[7] Lilivelt C L C, Lange W, Dolstra O. Intergeneric crosses for the transfer of resistance to the beet cyst nematode from *Raphanus sativus* to *Brassica napus*[J]. Euphytica, 1993, 68: 111-120.

[8] Rahman M H. Production of yellow-seeded *Brassica napus* through interspecific crosses[J]. Plant Breeding, 2001, 120(6): 463-472.

[9] 李懋学,张赞平.作物染色体及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1996:220-221.

[10] 申书兴,侯喜林,张成合.利用小孢子培养创建大白菜初级三体的研究[J].园艺学报,2006,33(6):1209-1214.

[11] 祝海燕,张成合,申书兴,等.结球甘蓝1号和4号染色体双三体及其初级三体的分离与鉴定[J].园艺学报,2005,32(4):695-697.

[12] 顾爱霞,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.

[13] 轩淑欣,郄丽娟,王彦华,等.FISH技术在大白菜初级三体额外染色体鉴定中的应用[J].农业生物技术学报,2007,15(4):725-726.