

大白菜—甘蓝异附加系的获得与鉴定

刘 炜, 申书兴*, 王彦华, 张成合, 轩淑欣, 陈雪平, 李晓峰, 罗双霞

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

摘 要: 异附加系是利用外源基因进行品种改良和基因组研究的重要材料。以大白菜—甘蓝异源三倍体 (AAC) 与二倍体大白菜 (AA) 回交一代 BC_1 为材料, 经过细胞学鉴定, 从中筛选出大白菜—甘蓝 7 号单体附加系 CO-7-1 和 9 号单体附加系 CO-9-2。在 CO-7-1、CO-9-2 自交后代中外源染色体出现频率分别为 35.3%、20.0%。从 CO-7-1 的自交后代中分离鉴定出二体异附加系 CO-7-1D 的比率为 11.8%。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; 染色体; 倍性; 异附加系

中图分类号: S 634.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 02-0207-06

A Study on Obtainment and Identification of Chinese Cabbage - Cabbage Addition Lines

LIU Wei, SHEN Shu-xing*, WANG Yan-hua, ZHANG Cheng-he, XUAN Shu-xin, CHEN Xue-ping, LI Xiao-feng, and LUO Shuang-xia

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

Abstract: Alien addition lines are important materials in variety improvement and genome research. In this study, two monosomic addition lines named CO-7-1 (Chinese cabbage with chromosome 7 from cabbage) and CO-9-2 (Chinese cabbage with chromosome 9 from cabbage) from the progenies of AAC \times AA were obtained by cytology identification. The transmitting rates of alien chromosome were 35.3% and 20.0% from the progenies of CO-7-1 and CO-9-2 self-crossing. The ratio of disomic addition lines CO-7-1D from the progenies of CO-7-1 self-crossing was 11.8%. The obtained alien addition lines could be used to analyze the genetic relationship between Chinese cabbage and cabbage, and synthesize their translocation lines and substitution lines.

Key words: Chinese cabbage; cabbage; chromosome; ploidy; addition line

大白菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson] 育种存在亲本材料单一, 遗传背景狭窄等问题。利用现代生物技术, 定向地向受体品种导入其他种的优良基因, 是解决这一问题的有效途径之一 (Chen et al., 1988; Jiang et al., 1994)。结球甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) 和大白菜同为芸薹属, 其适应性及抗逆性较强, 耐贮运, 营养丰富, 冬性强等优良性状, 是改良大白菜遗传背景的重要种质资源。

异附加系是指受体染色体组附加外源染色体的个体。根据所附加染色体的数目, 可将异附加系分为单体、二体 and 多重异附加系。其中又以单体和二体异附加系具有更重要的利用价值。

异附加系植株在形态学、细胞学、分子生物学等方面会出现一些与受体亲本不同的特征, 它不仅

收稿日期: 2007 - 07 - 05; 修回日期: 2007 - 12 - 03

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项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: shensx@mail.hebau.edu.cn)

能加快抗病或抗逆基因向栽培种转移 (Gao et al, 2001), 而且还可用于研究基因的表达、外源基因染色体作图 (Biyashev et al, 1997) 和染色体组特异性文库的构建 (Chetelat et al, 1998)。在小麦、水稻和洋葱等作物上, 利用异附加系转移优良性状已有许多成功应用的报道 (Barthes & Ricoh, 2001)。

本研究以河北农业大学园艺学院获得的大白菜—结球甘蓝异源三倍体 (AAC) (顾爱侠 等, 2006) 与二倍体大白菜 (AA) 回交的衍生后代为材料, 筛选大白菜—结球甘蓝异附加系, 并运用细胞学方法进行初步鉴定, 为选育成套异附加系并进一步研究和利用结球甘蓝有益基因提供基础材料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为大白菜—甘蓝异源三倍体 (AAC) 与二倍体大白菜 (AA) 回交一代 BC_1 及其自交后代 $BC_1 F_2$ 组培苗, 以及田间栽培的植株。所有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 花粉母细胞减数分裂观察

上午 9:00—11:00 采集盛花期 BC_1 植株幼小花序, 用卡诺氏液 (乙醇:冰乙酸 = 3:1) 固定 48 h 以上, 再换至 70%乙醇中, 置 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。

1.3 根尖细胞染色体数鉴定

将供试材料接种于 1/2MS 培养基上生根培养。在根长至 0.5~1.0 cm 时, 切取根尖放入 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸解离 8 min, 丙酸—铁—水合三氯乙醛—苏木精法染色, 压片镜检, 选取分散较好的分裂相, 计数染色体。统计至少 30 个以上细胞作为该植株的染色体数并拍照。

1.4 核型分析

选取 5 个染色体分散良好且形态清晰的细胞, 获得该植株花粉母细胞早中期染色体形态图, 按李懋学和张赞平 (1996) 的核型分析方法分析。

2 结果与分析

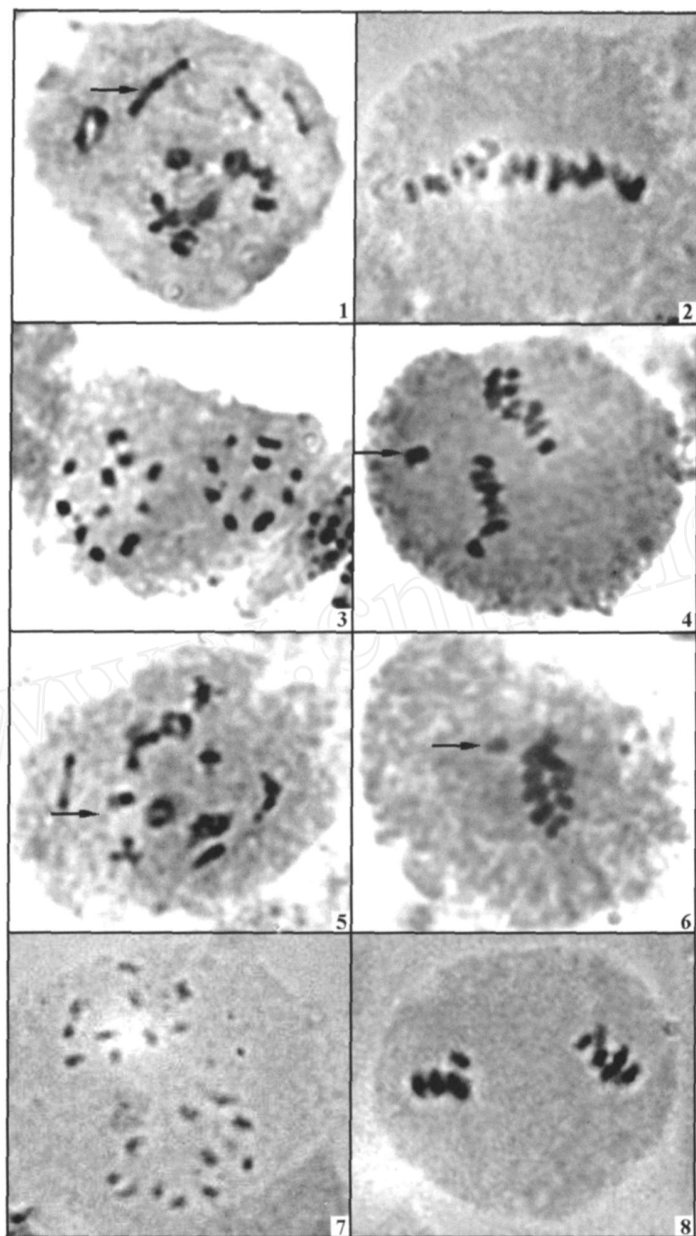
2.1 BC_1 植株染色体数的鉴定及单体异附加系的获得

通过对 BC_1 植株花粉母细胞减数分裂的观察, 获得两个 $2n = 21$ 的植株, 分别编号为 05-1 和 05-2。

植株 05-1 在减数分裂终变期主要以 9 个二价体和 1 个三价体 ($9 +$) 联会形式存在 (图版, 1)。中期 染色体均匀排列于赤道板上 (图版, 2)。后期 染色体以 11:10 方式分离 (图版, 3)。中期 有单个染色体游离于赤道板外 (图版, 4)。

植株 05-2 在减数分裂终变期主要以 10 个二价体和 1 个单价体 ($10 +$) 的联会形式存在 (图版, 5)。中期 单价体游离于赤道板外 (图版, 6), 后期 多以 11:10 方式分布 (图版, 7), 中期 染色体排列于赤道板两侧 (图版, 8)。

上述两个植株花粉母细胞的减数分裂过程存在明显差异。



图版 说明：

1. 05-1终变期，9 + （箭头所示）；2. 05-1中期，染色体排列于赤道板；3. 05-1后期，染色体 11 10方式分离；4. 05-1中期，单个染色体游离于赤道板外（箭头所示）；5. 05-2终变期，10 + （箭头所示）；6. 05-2中期，单个染色体游离于赤道板外（箭头所示）；7. 05-2后期，染色体 11 10方式分布；8. 05-2中期，染色体排列于赤道板。

Explanation of plates :

1. 05-1 diakinesis, 9 + (the arrow showed); 2. 05-1 metaphase, chromosomes move to equator plank; 3. 05-1 anaphase, chromosome distribution with 11 10; 4. 05-1 metaphase, the lone chromosome free move to cytoplasm (the arrow showed); 5. 05-2 diakinesis, 10 + (the arrow showed); 6. 05-2 metaphase, the lone chromosome free move to cytoplasm (the arrow showed); 7. 05-2 anaphase, chromosome distribution with 11 10; 8. 05-2 metaphase, chromosome move to equator plank

对植株 05-1和 05-2的组培苗根尖细胞有丝分裂中期核型分析，并与二倍体大白菜和结球甘蓝核型参数（祝海燕 等，2005；申书兴 等，2006）对比分析。

由表 1和图版 , 1可见, 05-1的核型由 6个中部着丝点染色体 (1号、3号、5号、6号、8号 和 11号)、4个近中部着丝点染色体 (4号、7号、9号和 10号) 和 1个端部着丝点染色体 (2号) 组成, 其中 2号为随体染色体, 11号为附加的单体染色体, 其形态特征和臂比值 (1.18) 与结球甘 蓝 7号染色体臂比值 (1.08) (祝海燕 等, 2005) 相近, 核型公式为 $2n = 2x + 1 = 10m + 8sm + 2st$ (SAT) + 1m, 初步确定 05-1为附加结球甘蓝 7号染色体的大白菜—结球甘蓝单体异附加系, 用 CO-7-1表示。

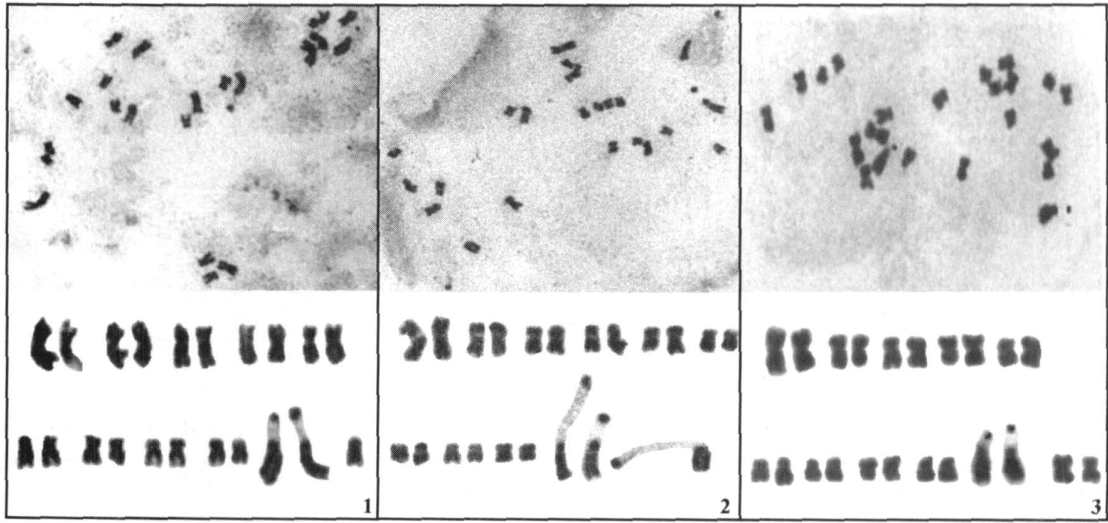
表 1 05-1根尖细胞有丝分裂中期核型参数

Table 1 Major characters of karyotype of 05-1 root tip in mitosis metaphase

染色体序号 No. of chromosome	染色体平均相对长度 (L + S) / % Average relative length	臂比值 (L / S) Average arm ratio	着丝点类型 Centromere type
1	7.57 + 6.12 = 13.69	1.24	m
2	9.04 + 2.70 = 11.75	3.34	st(SAT)
3	6.78 + 5.01 = 11.79	1.35	m
4	6.59 + 3.69 = 10.28	1.78	sm
5	5.19 + 4.54 = 9.73	1.14	m
6	5.44 + 4.09 = 9.53	1.33	m
7	4.85 + 2.49 = 7.33	1.95	sm
8	4.20 + 2.68 = 6.88	1.57	m
9	4.33 + 2.42 = 6.75	1.79	sm
10	3.60 + 2.08 = 5.68	1.73	sm
11*	3.58 + 3.02 = 6.60	1.18	m

注: SAT为随体染色体, 其相对长度和臂比值不计入随体的数据。*为异附加染色体。

Note: SAT represent the satellite chromosome, the figure of relative length and arm ratio didn't include the lengths of satellites " * " represent the alien addition chromosome.



图版 说明: 1. 05-1 (CO-7-1) 核型; 2. 05-2 (CO-9-2) 核型; 3. CO-7-1D核型;

Explanation of plates : 1. 05-1 (CO-7-1) karyotype; 2. 05-2 (CO-9-2) karyotype; 3. CO-7-1D karyotype

由表 2和图版 , 2可见, 05-2的核型由 5个中部着丝点染色体 (1号、3号、5号、6号和 8号)、5个近中部着丝点染色体 (4号、7号、9号、10号和 11号) 和 1个端部着丝点染色体 (2号) 组成, 其中 2号为随体染色体。11号为附加的随体染色体, 其形态特征和臂比值 (2.90) 与结球甘 蓝 9号染色体臂比 (2.92) (祝海燕 等, 2005) 相近, 核型公式为 $2n = 2x + 1 = 10m + 8sm + 2st$

(SAT) + 1 sm (SAT), 初步确定 05-2 为附加结球甘蓝 9 号随体染色体的大白菜—结球甘蓝单体异附加系, 用 CO-9-2 表示。

表 2 05-2 根尖细胞有丝分裂中期核型参数

Table 2 Major characters of karyotype of 05-2 root tip in mitosis metaphase

染色体序号 No. of chromosome	染色体平均相对长度 (L + S) / % Average relative length	臂比值 (L / S) Average arm ratio	着丝点类型 Centromere type
1	9.37 + 5.89 = 15.26	1.59	m
2	10.12 + 2.98 = 13.10	3.40	st (SAT)
3	7.45 + 4.64 = 12.08	1.61	m
4	6.04 + 3.36 = 9.41	1.80	sm
5	5.38 + 3.84 = 9.22	1.40	m
6	5.05 + 3.03 = 8.08	1.66	m
7	4.17 + 2.23 = 6.40	1.87	sm
8	3.79 + 2.50 = 6.29	1.51	m
9	3.90 + 2.24 = 6.14	1.80	sm
10	3.75 + 1.82 = 5.56	2.06	sm
11*	6.30 + 2.17 = 8.47	2.90	sm (SAT)

注: SAT 为随体染色体, 其相对长度和臂比值不计入随体的数据。* 为异附加染色体。

Note: SAT represent the satellite chromosome, the figures of relative length and arm ratio didn't include the lengths of satellites. " * " represent the alien addition chromosome.

2.2 单体异附加系外源染色体的传递率测定及二体异附加系的获得

对 CO-7-1 和 CO-9-2 的自交种 BC₁F₂ 的组培苗进行根尖细胞有丝分裂观察。从 CO-7-1 的自交后代中随机选取 17 株鉴定, 2n = 20 的有 11 株 (占 64.7%), 2n = 21 的 4 株 (占 23.5%), 2n = 22 的 2 株 (占 11.8%)。经核型分析, 4 个 2n = 21 植株均为附加结球甘蓝 7 号染色体的单体异附加系, 与 CO-7-1 核型分析结果一致。2 个 2n = 22 植株附加一对结球甘蓝 7 号染色体 (图版, 3), 核型公式为 2n = 2x + 2 = 10m + 8sm + 2st (SAT) + 2m, 初步确定其为附加结球甘蓝 7 号染色体的大白菜—结球甘蓝二体异附加系, 用 CO-7-1D 表示。由 CO-7-1 自交获得 CO-7-1D 的效率为 11.8%, 因而 CO-7-1 中异附加染色体的传递率为 35.3% (23.5% + 11.8%)。

从 CO-9-2 的自交后代中随机鉴定 15 株, 2n = 20 的有 12 株 (占 80.0%), 2n = 21 的有 3 株 (占 20.0%)。经核型分析, 3 个 2n = 21 植株均附加一条结球甘蓝 9 号随体染色体, 与 CO-9-2 核型分析结果一致, 因而 CO-9-2 中异附加染色体的传递率为 20.0%。

3 讨论

3.1 异附加系中外源染色体与大白菜染色体的亲缘关系

单体异附加系 CO-7-1 在减数分裂的终变期, 染色体以 9 + 形式联会, 而未见单价体出现; 中期染色体排列于赤道板, 由此可见, 附加的甘蓝 7 号染色体中与大白菜染色体有较高同源性。正由于同源性较强, 附加的甘蓝 7 号染色体在减数分裂过程中不易丢失, 致使 CO-7-1 自交后代附加的染色体传递率较高, 并获得了二体异附加系。

单体异附加系 CO-9-2 在减数分裂的终变期, 染色体以 10 + 形式联会, 而未见三价体出现, 中期有染色体游离于赤道板外, 说明附加甘蓝 9 号染色体与大白菜染色体同源性较低。由于同源性较低, 附加的甘蓝 9 号染色体在减数分裂过程中容易丢失, 致使 CO-9-2 自交后代附加的染色体传递率较低。

3.2 异附加系的利用

在本研究中, 附加的甘蓝染色体在减数分裂中期干扰了大白菜同源染色体的正常配对, 而且在减

数分裂不同时期出现提早分裂或落后等不规则现象,表明大白菜遗传背景中附加的外源染色体在减数分裂时具有不规则分裂行为,这与在小麦—簇毛麦单体异附加材料和小麦—多枝赖草单体异附加材料减数分裂期观察到的现象类似(赵茂林等, 2001; 李瑞芬等, 2002)。任正隆和张怀琼(1997)设计了用单体异附加材料作为工具诱导小麦—黑麦染色体小片段易位的系统方法,并认为单体异附加材料可作为基因转移的持久工具,异源染色体小片段可以插入受体染色体的不同部位,既诱导了较高频率的臂间易位,又有非臂间易位的发生。因此 CO-7-1、CO-7-1D 和 CO-9-2 是创建易位系和研究 A、C 基因组的优异种质资源。

References

- Barthes L, Ricoh A. 2001. Interspecific chromosomal rearrangements in monosomic addition lines of *Allium*. *Genome*, 44: 929 - 935.
- Biyashev R M, Ragab R A, Maughan P J, Saghai-Marouf M A. 1997. Molecular mapping, chromosomal assignment, and genetic diversity analysis of phytochrome bci in barley (*Hordeum vulgare*). *J Heredity*, 88: 21 - 26.
- Chen B Y, Heneen W K, Jonsson R. 1988. Resynthesis of *B. rassica napus* L. through interspecific hybridization between *B. alboglabra* Bailey and *B. campestris* L. with special emphasis on seed colour. *Plant Breeding*, 101: 52 - 59.
- Chetelat R T, Rick C M, Cisneros P, Alpert K B, DeVerna J W. 1998. Identification, transmission and cytological behavior of *Solanum lycopersicon* Dun. monosomic alien addition lines in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Genome*, 41: 40 - 50.
- Gao D, Guo D, Jung C. 2001. Monosomic addition lines of *Beta corolliflora* Zoss in sugar beet: cytological and molecular marker analysis. *Theor Appl Genet*, 103: 240 - 247.
- Gu Ai-xia, Shen Shu-xing, Chen Xue-ping, Zhang Cheng-he, Li Xiao-feng. 2006. Allotriploid hybrids obtained from interspecific hybridization between Chinese cabbage and cabbage and the preliminary research on reproductive characters. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (1): 73 - 77. (in Chinese)
- 顾爱侠, 申书兴, 陈雪平, 张成合, 李晓峰. 2006. 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. *园艺学报*, 33 (1): 73 - 77.
- Jiang J, Friebe B, Gill B S. 1994. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*, 73: 199 - 212.
- Li Mao-xue, Zhang Zan-ping. 1996. Crop chromosome and manipulation technique. Beijing: China Agricultural Press: 220 - 221. (in Chinese)
- 李懋学, 张赞平. 1996. 作物染色体及其研究技术. 北京: 中国农业出版社: 220 - 221.
- Li Rui-fen, Liang Hong-xia, Zhao Mao-lin. 2002. The meiotic behavior of an alien chromosome in *Triticum aestivum* - *Haynaldia villosa* monosomic addition lines. *Scientia Agricultura Sinica*, 35 (2): 127 - 131. (in Chinese)
- 李瑞芬, 梁宏霞, 赵茂林. 2002. 小麦—簇毛麦单体异附加材料外源染色体减数分裂行为的研究. *中国农业科学*, 35 (2): 127 - 131.
- Ren Zheng-long, Zhang Huai-qiong. 1997. Induction of translocation of small chromosomal segment between rye and wheat. *Science in China: Series C*, 27 (3): 258 - 263. (in Chinese)
- 任正隆, 张怀琼. 1997. 小麦—黑麦染色体小片段易位的诱导. *中国科学: C辑*, 27 (3): 258 - 263.
- Shen Shu-xing, Hou Xi-lin, Zhang Cheng-he. 2006. A study on obtaining primary trisomics by the isolated microspore culture of autotetraploid Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (6): 1209 - 1214. (in Chinese)
- 申书兴, 侯喜林, 张成合. 2006. 利用小孢子培养创建大白菜初级三体的研究. *园艺学报*, 33 (6): 1209 - 1214.
- Zhao Mao-lin, Li Rui-fen, Liang Hong-xia, Zhang Xue-yong. 2001. The meiotic behavior of an alien chromosome in *Triticum aestivum* - *Leymus multicaulis* monosomic addition lines. *Progress in Natural Science*, 11 (9): 945 - 949. (in Chinese)
- 赵茂林, 李瑞芬, 梁宏霞, 张学勇. 2001. 小麦—多枝赖草单体异附加材料减数分裂期外源染色体的行为研究. *自然科学进展*, 11 (9): 945 - 949.
- Zhu Hai-yan, Zhang Cheng-he, Shen Shu-xing, Wang Dong-ping, Guo Li-juan. 2005. Identification of the double trisomics and its primary trisomics in cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 695 - 697. (in Chinese)
- 祝海燕, 张成合, 申书兴, 王东平, 郭丽娟. 2005. 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. *园艺学报*, 32 (4): 695 - 697.