

非对称体细胞融合获得花椰菜与 *Brassica spinescens* 的种间杂种

姚星伟^{1,2} 刘 凡^{2*} 云兴福¹ 赵 泓² Ryschka U³ Schumann G³

(¹ 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019; ² 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089; ³ 德国联邦作物育种中心园艺作物研究所, 奎德林堡 D-06484)

摘 要: 拟利用非对称原生质体融合技术向芸薹属花椰菜中转移野生抗逆性状。供体 *Brassica spinescens* 具有光合效率高, 抗白锈病、蚜虫、黑斑病, 耐盐等优良特性。用经 UV 处理的供体叶肉原生质体与花椰菜下胚轴原生质体通过聚乙二醇 (PEG) 融合, 培养后获得 379 株再生植株。对其中的 120 株进行过氧化物同工酶分析和 RAPD 分子标记检测, 证明有 23 株为杂种植株。流式细胞仪倍性分析表明, 杂种植株核 DNA 含量全部高于供、受体亲本核 DNA 含量总和, 植株倍性在四至八倍之间。还对供体不同 UV 射线处理的剂量进行了初步探索, 结果表明 $0.0750 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 为最大辐射剂量。

关键词: 芸薹属; 种间杂种; 非对称体细胞融合; 原生质体培养; 杂种鉴定

中图分类号: S 635.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1039-06

Interspecific Hybridization between *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* and *Brassica spinescens* via Asymmetric Somatic Protoplast Fusion

Yao Xingwei^{1,2}, Liu Fan^{2*}, Yun Xingfu¹, Zhao Hong², Ryschka U³, and Schumann G³

(¹ Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; ² Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China; ³ Institute of Horticultural Crops of Federal Center for Breeding Research on Cultivated Plants, Neuer Weg 22/23, Quedlinburg D-06484, Germany)

Abstract: A symmetric protoplast fusion between *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* and *B. spinescens* was taken for transferring of wild resistant traits into *B. oleracea*. *B. spinescens* possesses desirable characteristics such as high photosynthetic efficiency, resistance to the white rust (caused by *Albugo candida*), aphid and alternaria blights (caused by *Alternaria brassicae*) and tolerance to salt. PEG (polyethyleneglycol) induced asymmetric fusions were performed between mesophyll protoplasts of *B. spinescens* irradiated with UV and hypocotyl protoplasts of *B. oleracea* L. var. *botrytis*, and 379 regenerated plants were obtained. Peroxidase isozyme (POX) analysis was taken in 120 plants, and 23 of them showed hybrid characters that were confirmed by the RAPD marker detection. The relative nuclear DNA content of the hybrids measured by flow cytometry (FCM) showed that all of the 23 analyzed plants had a DNA content from tetraploidy to octaploidy. Influence of UV doses had been tested, and results showed that the maximum UV dose for *B. spinescens* was $0.0750 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Key words: *Brassica*; Interspecific hybrid; Asymmetric somatic fusion; Protoplast culture; Hybrid identification

花椰菜为十字花科 (Cruciferae) 芸薹属甘蓝种的一个变种 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.)。花椰菜生产中常常遭受黑腐病、霜霉病、黑斑病、蚜虫、小菜蛾等病虫害的威胁, 严重影响花椰菜产量和品质, 而现有的育种材料还不能满足培育抗病抗逆等多抗性新品种的需要。利用野生材料中的优异抗性基因, 是进一步创造新的育种基础材料的有效途径。非对称体细胞融合技术可以克服常规育种

收稿日期: 2005 - 03 - 04; 修回日期: 2005 - 04 - 13

基金项目: 北京市自然科学基金重大项目 (5050001)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: liufan@nerv.com)

方法中远缘杂交不亲和的问题;同时与对称融合相比,由于形成的杂种中一般只含有供体的部分染色体,因此在提高杂种的育性及缩短育种年限等方面具有一定的优势。育种学家已经成功地将许多抗逆基因转移到栽培品种中,提高了栽培品种的抗逆性。芸薹属野生种 *B. rassaica spinescens* 分布在北非石灰质的海岸或硅质的悬崖峭壁上,具有光合效率高,抗白锈病、黑斑病、蚜虫和耐盐等优良特性^[1,2]。本试验试图通过非对称体细胞杂交途径,将其抗病及抗逆性状转育到花椰菜中,以探索花椰菜基因改良的新途径,为新品种选育提供优良的育种材料。

1 材料与方法

1.1 材料及其原生质体的制备

供体 *B. spinescens* 来自德国联邦作物育种中心园艺作物研究所。受体花椰菜编号 '0307', 具有良好原生质体培养及植株诱导能力, 抗病性较差。

供体无菌苗培养在 MS 培养基^[3]中, 每次取 3~5 片幼叶用于供体叶肉原生质体制备。每次试验取 100 粒受体种子, 经次氯酸钠溶液消毒后培养在 MS 培养基上, 24 暗培养 6 d 后, 取下胚轴用于原生质体制备。收集到的叶肉原生质体调整浓度至 2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 然后分别用剂量为 0.0500、0.0625 和 0.0750 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 UV 射线照射, 用于下一步的原生质体融合。

1.2 原生质体的融合及植株再生

分别调整供、受体原生质体浓度至 2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 按 1:1 的比例混合。融合方法采用聚乙二醇 (PEG) 融合法^[4]。最后加入 2 mL 培养基 1 (B_5 培养基大量元素、微量元素和有机成分; 水解酪蛋白 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (单位下同), 二水合氯化钙 875, 山梨糖醇 45 500, 甘露醇 45 500, 葡萄糖 2 500, 2-脱氧-D-核糖 125, 2, 4-二氯苯氧乙酸 0.5, 萘乙酸 0.2, 6-苄氨基嘌呤 0.2; pH 5.8~6.0) 用于融合原生质体培养^[4]。

24 黑暗中培养 3~7 d, 当观察到正常的细胞分裂时, 向每培养皿中加入 400 μL 培养基 2 (B_5 培养基大量元素、微量元素和有机成分; 水解酪蛋白 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (单位下同), 葡萄糖 2 500, 2-脱氧-D-核糖 125, 蔗糖 20 000, 2, 4-二氯苯氧乙酸 0.5, 萘乙酸 0.2, 6-苄氨基嘌呤 0.2; pH 5.8~6.0), 此后每 3 d 加入 1 次培养基 2。大约 14 d 以后有细胞团出现时, 转移到培养基 3 (B_5 培养基大量元素、微量元素和有机成分; 水解酪蛋白 150, 蔗糖 30 000, 2, 4-二氯苯氧乙酸 0.5, 萘乙酸 0.2, 6-苄氨基嘌呤 0.2, 琼脂 10 000; pH 5.8~6.0) 中促使愈伤组织形成, 同时转为正常光照培养。当愈伤组织长到约 5 mm 时, 转移愈伤组织到培养基 4 (MS 大量元素和微量元素; B_5 有机成分; 水解酪蛋白 150, 蔗糖 30 000, 萘乙酸 0.2, 6-苄氨基嘌呤 2.0, 琼脂 1 000; pH 5.8~6.0) 中, 诱导不定芽形成。当幼苗的真叶形成时, 转移到无激素的 MS 培养基中使再生植株正常生长并生根。

1.3 杂种植株鉴定

1.3.1 同工酶鉴定杂种植株 利用聚丙烯酰胺等点聚焦电泳技术, 应用过氧化物酶 (POX) 鉴定杂种植株^[5]。

1.3.2 RAPD 分子标记鉴定杂种植株 植株 DNA 提取采用 CTAB 法^[6]。从 50 条随机引物中筛选出引物: 5'-ACCAGGTTGG-3', 进行杂种鉴定。反应循环条件为 94 预变性 3 min; 94 变性 60 s, 37 退火 60 s, 72 延伸 90 s, 共 5 个循环; 94 变性 60 s, 40 退火 60 s, 72 延伸 90 s, 共 35 个循环; 最后 72 延伸 10 min。

1.3.3 流式细胞仪鉴定杂种植株倍性 取再生植株和供、受体亲本叶片各 2 g, 分别加入 2 mL 细胞裂解液, 以锋利刀片切碎组织, 过滤、离心后用 PI 染液对核 DNA 进行染色, 30 min 后用流式细胞仪 (BD FACSCalibur) 进行植株倍性鉴定。

2 结果与分析

2.1 融合植株的获得

在培养 3 d之内，融合的原生质体与未发生融合的受体原生质体在外观上明显不同。用 Nikon Diaphot倒置显微镜（200 ×）观察，发现融合的细胞中有明显的供体叶绿体存在，而未融合的受体原生质体由于来源于暗培养的下胚轴，不含有叶绿体，此特征可以作为早期鉴别杂种细胞的标志。培养 5 d后，能观察到细胞的第 1次分裂（图 1，a），培养 14 d左右，观察到小细胞团形成（图 1，b），这标志着细胞具有继续分裂的能力。原生质体培养 25 d之后，形成肉眼可见的愈伤组织（图 1，c）。当愈伤组织约 5 mm时，转移到培养基 4中诱导芽的形成，之后大约 40 d可以观察到芽点形成。幼苗的真叶形成后，及时转到无激素的 MS基本培养基中可获得生长正常的植株。

试验中设计了不同的 UV 辐射剂量，以期确定处理供体 *B. spinescens* 适宜的最大辐射剂量。当用较低剂量的 UV 射线处理供体原生质体时（0.0500、0.0625和 0.0750 J · cm⁻²），可以得到愈伤组织并且获得再生植株。当辐射剂量较高时（0.1000、0.2000和 0.3000 J · cm⁻²），不能获得小细胞团。因此认为应用于 *B. spinescens* 的 UV 最大辐射剂量为 0.0750 J · cm⁻²（表 1）。

2.2 形态学鉴定

对再生植株进行形态学观察发现，再生植株可以分为两种类型，一种是受体类型（图 1，d），一种是中间类型（图 1，f）。受体类型的叶片形状与受体亲本类似，叶缘呈锯齿形；中间类型再生植株叶片在形态上与受体的最大区别是叶缘平滑，这与供体的叶片形状相类似（图 1，e）。

表 1 不同 UV 剂量对融合后原生质体愈伤组织形成和植株再生的影响

Table 1 Effect of different UV doses on microcallus formation and plant regeneration after protoplast fusion

UV 辐射剂量 Dose of UV (J · cm ⁻²)	每皿愈伤组织数 Number of microcalli per dish	再生植株数 Number of regenerated plants
0.0500	9	10
0.0625	15	13
0.0750	12	13
0.1000	0	0
0.2000	0	0
0.3000	0	0

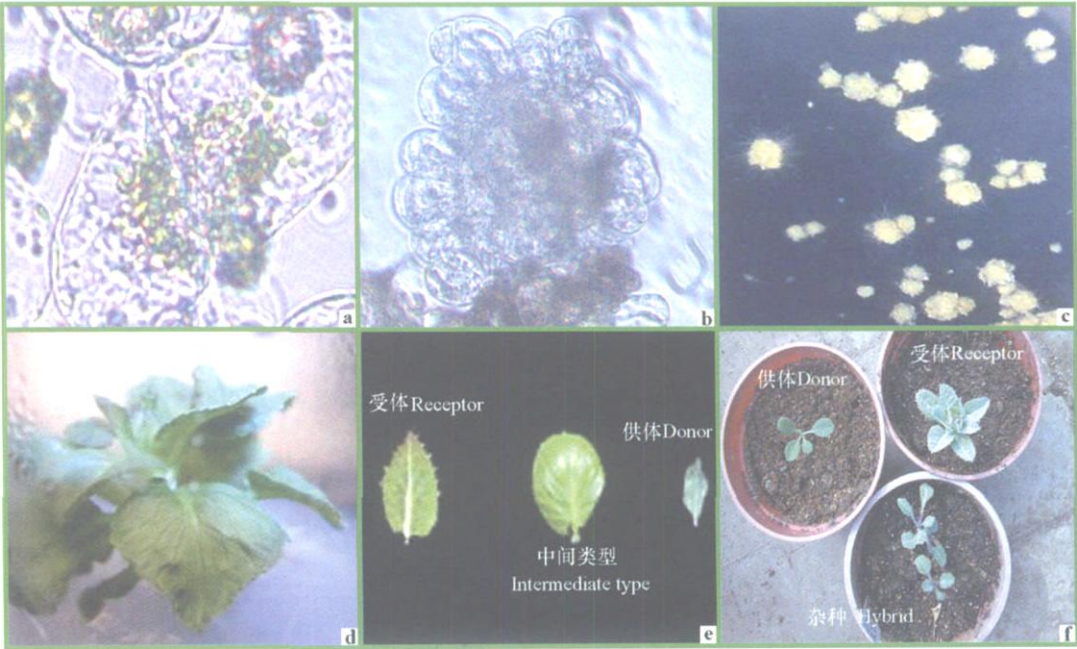


图 1 原生质体融合和植株再生

a: 融合细胞第 1次分裂（200 ×）；b: 培养 14 d后形成的小细胞团（200 ×）；c: 1~5 mm愈伤组织团；d: 受体类型杂种植株；e: 植株叶片形态比较；f: 供体、受体和杂种植株。

Fig 1 Protoplast fusion and plant regeneration

a: The first cell division of fused protoplasts (200 ×); b: Microcalli formed after 14 days of culture (200 ×); c: 1 - 5 mm callus; d: Receptor-type hybrid; e: Leaf morphology comparison among parents and hybrid; f: Donor, receptor and hybrid plants

2.3 POX鉴定杂种植株

筛选了酯酶 (EST)、过氧化物酶 (POX) 和磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 3种酶, 同时对两亲本的不同生长时期酶谱进行了比较。其中只有 POX在两亲本中表现出差异 (图 2), 并且在植株不同生长时期亲本条带表现稳定、重复性好, 说明 POX可以用于杂种植株的鉴定。从图 2中可以清楚看出供体与受体相比有 3条明显的特异条带。对 120株再生植株进行了 POX同工酶鉴定, 发现其中有 23株具有供体的特异条带 II (图 2), 只有 1株同时具有供体亲本的 3条特异条带 (图 2, 泳道 6)。

2.4 利用 RAPD 分子标记鉴定杂种

将筛选出的引物 (5'ACCAGGTGG 3') 用于杂种植株鉴定。图 3为杂种鉴定结果, 可以看出: 供体植株 *B. spinescens* 呈现两条多态性条带, 大小分别约 1 200 bp和 800 bp, 受体 '0307' (*B. oleracea* L. var *botrytis*) 有 1条多态性条带, 大小约 700 bp。两亲本之间有明显的差异。在检测的再生植株中, 8、9、12、13和 14分别在 1 200 bp和 700 bp处扩增出明显的带, 说明含有供体的特异条带, 因此证明是体细胞杂种。对这些杂种植株的叶片形态观察发现, 有的呈受体型 (图 1, d), 有的呈中间型 (图 1, f)。

2.5 再生植株的倍性鉴定

对同工酶鉴定出的 23株再生植株进行流式细胞仪倍性鉴定, 发现杂种植株的核 DNA 含量全部高于供、受体亲本核 DNA 含量总和, 杂种植株倍性在四倍至八倍之间, 其中 41%为四倍体, 12%为八倍体, 47%为非整倍体。图 4为供、受体亲本和经 RAPD 鉴定为杂种植株 (图 3, 泳道 12) 的核 DNA 倍性分析图。把供受体亲本和杂种植株混合加样后在流式细胞仪上检测的结果与样本分别加样所得结果完全相同。从图 4中可以看出供体亲本 G_1 期 () 位于 23.30道处, 受体亲本 G_1 期

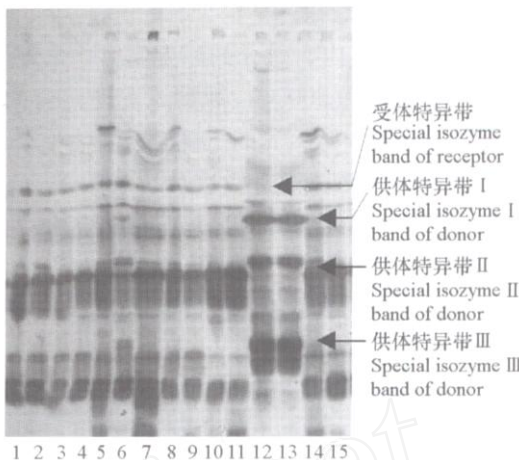


图 2 利用过氧化物同工酶 (POX) 鉴定杂种植株

10、11: 受体 '0307' (*B. oleracea* L. var *botrytis*);
12、13: 供体 *B. spinescens*; 2、5、6、7、8、9和
14: 杂种植株; 1、3、4和 15: 非杂种植株。

Fig 2 Hybrids identification by peroxidase isozyme (POX) analysis

10、11: Receptor '0307' (*B. oleracea* L. var *botrytis*);
12、13: Donor *B. spinescens*; 2、5、6、7、8、9、14: Hybrid
plants; 1、3、4、15: Non-hybrid plants

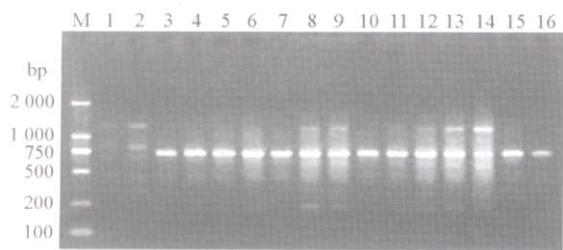


图 3 18号引物 RAPD 扩增结果

1、2: 供体 *B. spinescens*; 3、4: 受体 '0307' (*B. oleracea* L. var *botrytis*); 8、9、12、13和 14: 杂种植株; 5、6、7、10、11、15和 16: 非杂种植株。

Fig 3 RAPD pattern of somatic hybrids amplified using primer

1、2: Donor *B. spinescens*; 3、4: Receptor '0307' (*B. oleracea* L. var *botrytis*); 8、9、12、13、14: Hybrid plants; 5、6、7、10、11、15、16: Non-hybrid plants

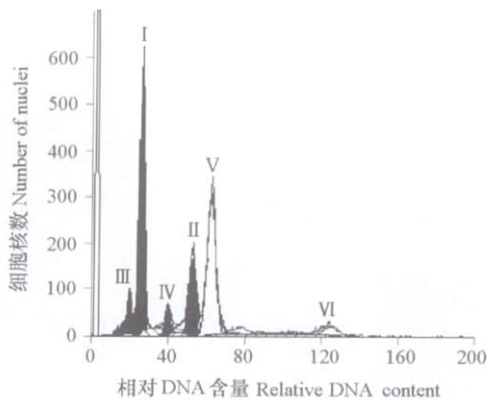


图 4 流式细胞仪杂种倍性分析

、 分别为受体亲本的 G_1 和 G_2 期; 、 分别为供体亲本的 G_1 和 G_2 期; 、 分别为杂种的 G_1 和 G_2 期。

Fig 4 Ploidy analysis by flow cytometry

, : G_1 and G_2 phase of receptor; , : G_1 and G_2 phase of donor plant; , : G_1 and G_2 phase of hybrid plant

() 位于 26.08 道处, 这与供、受体染色体数比例完全吻合 (16/18 0.89), 因此可以作为鉴定杂种倍性的标准。杂种植株 G_1 期位于 62.45 道处 (), 说明其倍性大于四倍。与 RAPD 结果相结合, 说明该杂种植株可能是两个以上异核细胞融合的结果。

2.6 形态学、同工酶和 RAPD 分子标记鉴定杂种植株比较

随机抽取 20 株再生植株分别进行形态学、同工酶 (POX) 和 RAPD 分子标记鉴定, 结果发现在检测的 20 株植株中, 通过形态学鉴定只有 2 株为杂种植株 (中间类型), 其余都是非杂种植株 (受体类型); 同工酶、RAPD 鉴定均有 6 株为杂种植株, 其中有 4 株是两种鉴定方法同时证明为杂种植株。再生植株 5、6 通过同工酶鉴定为杂种, 而 RAPD 鉴定为非杂种; 再生植株 19、20 通过 RAPD 鉴定为杂种, 同工酶鉴定为非杂种 (表 2)。从以上结果可以看出, 同工酶鉴定结果有 70% 与 RAPD 鉴定结果相同, 而形态学鉴定结果与同工酶、RAPD 鉴定结果相差较大。

表 2 形态学、同工酶和 RAPD 分子标记方法鉴定杂种结果比较

Table 2 Comparison of morphology, isozyme and RAPD analysis on hybrid identification			
植株编号 Plant code	形态鉴定 Morphology identification	同工酶鉴定 Isozyme analysis	RAPD 鉴定 RAPD analysis
1	+	+	+
2	+	+	+
3	-	+	+
4	-	+	+
5	-	+	-
6	-	+	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	+
20	-	-	+

注: “+” 杂种植株; “-” 非杂种植株。

Note: “+”: hybrid plant; “-”: non-hybrid plant

3 讨论

试验通过非对称融合技术成功获得了芸薹属种间体细胞杂种, 杂种植株的抗逆性正在鉴定中。发现形态鉴定也未必准确可靠, 可能由于经 UV 辐射处理后的供体染色体在融合细胞的分裂分化过程中易造成部分或整条外源染色体丢失, 因此杂种植株形态大多倾向于受体类型^[4,7]。同工酶鉴定中由于一种同工酶只能反映基因组的部分情况, 不能反映整个植株基因组的组成, 因此有可能不能反映部分植株的杂种特性, 同时样品制备、检测方法及灵敏度等原因也使其在杂种植株的鉴定上有一定局限性^[8]。RAPD 分子标记鉴定过程中, 由于使用的引物有限, 也只能反映植株基因的部分组成情况。因此只有综合运用形态学、同工酶和 RAPD 等方法进行杂种植株的鉴定才是科学和准确的。

选择细胞分裂能力和再生植株能力强的材料作为受体, 是非对称融合成功的关键 (数据略)。试验选择的受体原生质体从细胞分裂到形成肉眼可见的愈伤组织需 25 d 左右, 愈伤组织在培养 40 d 后亦可看见芽点形成。而有些材料的原生质体细胞分裂能力弱, 培养初期细胞不分裂或分裂几次后即停止、或出现小细胞团褐化, 最终不能形成植株; 有的品种虽然细胞分裂和愈伤组织形成能力较强, 但植株再生能力差, 不适用于进行非对称融合 (数据略)。在用 UV 射线处理供体原生质体时发现, 当用较低剂量的 UV 射线处理供体原生质体时, 可以得到愈伤组织并获得融合植株; 辐射剂量过高则不能获得细胞团, 说明辐射剂量过高不但对供体原生质体伤害较大, 还会导致融合原生质体分裂能力下降, 甚至导致融合细胞死亡。这与 Samoylov^[9]得出的结论类似, Samoylov 用番茄与 *L. pennellii* 的有性杂交种和茄子融合时, 发现只有 X 射线在最低辐射剂量——100 Gy 时有植株再生, 高剂量处理供体原生质体不能形成愈伤组织。

在杂种倍性鉴定中, 发现杂种植株的倍性普遍偏高, 此现象在蔡兴奎等^[10]的研究中也曾提到, 但未做任何解释。作者认为可能与两个因素有关: 第一, 原生质体经 PEG 处理后多个细胞发生融合所致; 第二, 融合细胞的愈伤组织在生长和分化过程中发生了染色体结构和数目的变异所致^[11]。同

工酶、RAPD分子标记和流式细胞仪可以作为鉴定杂种的有效手段,但这些手段又存在相似的缺陷,即都不能鉴别杂种植株染色体的具体构成情况。在以后的工作中可以利用 AFLP、GISH或 FISH等试验手段对非对称融合杂种的非对称水平、染色体组成及 UV辐射剂量与供体染色体丢失情况之间的关系进行进一步研究^[12]。

参考文献:

- 1 Kiriti P B. Interspecific hybridization between *B. russica juncea* and *B. spinescens* through protoplast fusion. *Plant Cell Reports*, 1991, 9: 639 ~ 642
- 2 Agnihotri A, Lakshmikumaran M, Shivanna K R. Current plant science and biotechnology in agriculture. Dordrecht Boston: Kluwer Academic Publisher, 1993. 270 ~ 274
- 3 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473 ~ 497
- 4 Ryschka U, Schumann G, Klocke E, Scholze P, Neumann M. Somatic hybridization in Brassicaceae. *Acta Horticulturae*, 1996, 407: 201 ~ 208
- 5 郑晓鹰, 李 丽, 邢宝田. 同工酶差异位点分析在蔬菜杂交种纯度检测中的应用. *华北农学报*, 2001, 16 (1): 56 ~ 62
Zheng X Y, Li L, Xing B T. Determining vegetable hybrid seed purity by isoenzyme diagnostic loci. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2001, 16 (1): 56 ~ 62 (in Chinese)
- 6 王 珍, 方宣钧. 植物 DNA 分离. *分子植物育种*, 2003, 2: 281 ~ 288
Wang Z, Fang X J. Plant DNA isolation. *Molecular Plant Breeding*, 2003, 2: 281 ~ 288 (in Chinese)
- 7 Li C L, Xia G M, Xiang F N, Zhou C E, Cheng A X. Regeneration of asymmetric somatic hybrid plants from the fusion of two types of wheat with Russian wild rye. *Plant Cell Reports*, 2004, 23 (7): 461 ~ 467
- 8 雷红灵, 张光华. 同工酶在园艺植物中的应用研究. *湖北民族学院学报*, 1999, 17 (4): 19 ~ 23
Lei H L, Zhang G H. Study on the application of isozyme to the garden plant. *Journal of Hubei Institute for Nationalities*, 1999, 17 (4): 19 ~ 23 (in Chinese)
- 9 Sanoylov Y M, Sink K. The role of irradiation dose and DNA content of somatic hybrid calli in producing asymmetric plants between an interspecific tomato hybrid and eggplant. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 850 ~ 857
- 10 蔡兴奎, 柳 俊, 谢从华. 马铃薯栽培种与野生种叶肉细胞融合与体细胞杂种鉴定. *园艺学报*, 2004, 31 (5): 623 ~ 626
Cai X K, Liu J, Xie C H. Mesophyll protoplast fusion of *Solanum tuberosum* and *Solanum chacoense* and their somatic hybrid analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31 (5): 623 ~ 626 (in Chinese)
- 11 Gavrilenco T, Thieme R, Tiemann H. Assessment of genetic and phenotypic variation among intraspecific somatic hybrids of potato, *Solanum tuberosum* L. *Plant Breeding*, 1999, 118 (3): 205 ~ 213
- 12 Skarzhinskaya M, Fahleson J, Glimelius K. Genome organization of *B. russica napus* and *Lesquerella fendleri* and analysis of their somatic hybrids using genomic in situ hybridization. *Genome*, 1998, 41 (5): 691 ~ 701

新书推荐

《果树钙素营养与生理》

本书是针对目前我国果实品质下降和生理病害日趋严重的现实编写的。全书共分六章,比较详细地总结了果树缺钙症、果实钙素营养水平的调节, Ca^{2+} 在树体内的运转与分配规律,钙与花芽分化、花粉萌发和花粉管生长、结实及发育之间的关系,钙参与果实成熟衰老和抗逆性的调控机制,以及典型缺钙症——苹果苦痘病研究的评述等。

本书由关军锋、(德)索尔编著,北京:科学出版社,2005年7月出版,可作为大专院校和科研单位的果树学、植物生理学、植物营养学等相关专业人员的参考书。定价:52元(含邮费)

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编100081。