

# 大白菜、青花菜和叶用芥菜体细胞杂交种形态学与细胞学特性鉴定

廉玉姬\*, 林光哲, 赵小梅

(临沂大学生命科学学院, 山东临沂 276005)

**摘要:** 为拓宽十字花科蔬菜育种种质资源, 以大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)、青花菜 (*B. oleracea* L. var. *varitalica*) 和叶用芥菜 (*B. juncea* L. Czern) 的子叶、下胚轴为材料, 分离、纯化原生质体, 采用 40% 聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 融合法进行原生质体融合。融合细胞在附加 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 2, 4-D + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 激动素 (kinetin) 的改良 K8p 培养基中液体培养, 当细胞分裂至 8~10 细胞期时, 将分裂的细胞包埋于 0.15% 琼脂糖, 然后在添加 0.3 mol · L<sup>-1</sup> 蔗糖和 2 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 2 mg · L<sup>-1</sup> 玉米素 (zeatin) + 1 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> kinetin 的 Kao 培养基中诱导愈伤组织。将培养获得的 936 个愈伤组织转到 3 种不定芽诱导培养基 MS + 5 mg · L<sup>-1</sup> zeatin + 2 mg · L<sup>-1</sup> IAA; MS + 2 mg · L<sup>-1</sup> zeatin + 2 mg · L<sup>-1</sup> IAA; MS + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA 上诱导芽分化, 当芽长 3 cm 左右时, 转到 1/2 MS + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA 的生根培养基上诱导生根, 共获得了 96 株再生植株, 对其进行形态学、细胞学和分子生物学鉴定。形态学观察显示再生植株表型变化大, 包括 3 个亲本的中间型或两个亲本的中间型; PCR 技术鉴定结果显示 96 株杂种植株中 93 株为细胞质雄性不育特性; 染色体计数显示, 再生的植株染色体数变化范围广 (2n = 38~64), 但未发现染色体数总和与 3 种融合亲本染色体数总数 (2n = 74) 相一致的个体。基因组原位杂交 (Genomic in situ hybridization, GISH) 和扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 分析结果表明, 再生植株基因组中分别检测出大白菜、青花菜、叶用芥菜的 DNA 片段, 证实了大白菜、青花菜、叶用芥菜种间体细胞杂交种的真实性。

**关键词:** 芸薹属; 体细胞杂交; 原生质体; 植株再生; 形态学; 基因组原位杂交 (GISH)

**中图分类号:** S 634.3; S 635; S 637.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2011) 11-2099-12

## Morphological and Cytological Characterization of Somatic Hybrids Obtained by Tri-parental Protoplast Fusion in *Brassica* Species

LIAN Yu-ji\*, LIN Guang-zhe, and ZHAO Xiao-mei

(College of Life Science, Linyi University, Linyi, Shandong 276005, China)

**Abstract:** To obtain various genetic resources, interspecific tri-parental somatic hybridization among *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (2n = 20, AA), *B. oleracea* L. var. *varitalica* (2n = 18, CC), and *B. juncea* L. Czern (2n = 36, AABB) was performed. Protoplasts were isolated from hypocotyls and

收稿日期: 2011-08-31; 修回日期: 2011-10-12

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (Y2008D17)

\* E-mail: lianyuji@lyu.edu.cn

cotyledons, and fused using the 40% polyethylene glycol (PEG). Fused protoplast were cultured in modified K8p medium supplemented with  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-D,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA,  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, and  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin, and  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  mannitol as osmoticum. At the 8 – 10-cell stage, divided cells were transferred to Kao's basal medium supplemented with  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  sucrose as carbon source, and 0.15% agarose,  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA,  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin,  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin for callus proliferation. After 35 days, when small calli reached 2 – 3 mm in diameter, calli were transferred to regeneration medium (MS +  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; MS +  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; MS +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA). A total 96 regenerated plants were obtained from 932 calli. Several phenotypes were obtained in the somatic hybrids, showing differences in leaf morphology, flower size and color. Most of the plants showed intermediate characteristics between two or more of the parental species. Cytoplasmic male sterility (CMS) identified by polymerase chain reaction (PCR) amplification using Ogura CMS specific primers. Putative somatic hybrids were identified by cytological and morphological analyses. The chromosome numbers of the somatic hybrids varied from 38 to 64, which was less than the sum of the parental lines. The somatic hybridity was confirmed by Genomic in situ hybridization (GISH) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis.

**Key words:** *Brassica*; interspecific; tri-parental somatic hybridization; protoplast; plant regeneration; morphology; genomic in situ hybridization

由于人类长期定向选择, 导致主要农作物的遗传多样性已经远远小于其原始物种, 日益变窄的遗传基础已成为限制育种发展的主要因素 (Tanksley & McCouch, 1997; Zamir, 2001)。在芸薹属作物中, 种间杂交通常作为扩大种质变异的手段 (Snowdon et al., 2006), 但有性杂交常由于种间杂交不亲和、杂种一代的育性低等问题而严重限制所需基因渗入 (Wang et al., 2005)。体细胞杂交技术能够克服有性杂交不亲和等障碍, 可获得有性杂交无法实现的多样变化的新物种 (Li et al., 2009)。在芸薹属作物中已成功地获得了种间、属间甚至族间的体细胞杂交异源多倍体 (Cardi & Earle, 1997; Sigareva & Earle, 1999; Navrátilová, 2004; 姚兴伟 等, 2005; Wang et al., 2006; Prakash et al., 2009; Lian et al., 2011)。通过远缘杂交转移近缘种的遗传物质, 可拓宽作物育种的遗传基础, 创新种质资源。

本试验中以具有 Ogura 萝卜细胞质雄性不育 (Ogura CMS) 的大白菜 (KW67) 和青花菜 (KW105)、无 CMS 特性的叶用芥菜 (KW68) 的子叶与下胚轴为材料分离原生质体, 通过原生质体融合、培养获得了大白菜、青花菜与叶用芥菜之间的种间体细胞杂交种。通过形态学、细胞学、分子生物学检测方法鉴定体细胞杂交种的特性。旨在建立 3 种原生质体融合、培养及植株再生体系, 拓宽芸薹属蔬菜育种种质资源, 讨论 3 种体细胞杂交种的遗传特性和染色体丢失可能机理, 为芸薹属蔬菜种质创新研究提供新依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为具有 CMS 特性的纯系大白菜 ‘KW67’ (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* AA,  $2n = 20$ )、青花菜 ‘KW105’ (*B. oleracea* L. var. *varitalica*, CC,  $2n = 18$ ), 叶用芥菜 ‘KW68’ (*B. juncea* L. Czern, AB,  $2n = 36$ ) 无 CMS 特性的种子, 2001 年引自韩国中央种苗公司。

将种子在超净工作台上进行表面消毒处理。用 70% 的乙醇表面消毒 30 s, 无菌水洗 3 次; 在加 1 滴吐温 - 20 的 1% 次氯酸钠中浸泡 10 min, 中间摇动几次; 用无菌水淋洗 5 ~ 6 次, 洗好的种子在 1/2 MS (Murashige & Skoog, 1962) 基本培养基上萌发, 在  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、光照  $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 光照强度  $4\,000 \text{ lx}$  下培养 7 d 后, 取子叶和下胚轴用于原生质体制备。

## 1.2 原生质体的分离、融合

原生质体分离和纯化参照 Lian 和 Lim (2001) 的方法。取培养 7 d 的大白菜、青花菜和叶用芥菜的子叶与下胚轴, 分别在 TVL ( $54.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  山梨醇,  $7.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 5.6 ~ 5.8) 溶液中切碎, 静置 30 min, 促使质壁分离。用滴管吸去 TVL 溶液并加入适量酶混合液, 于  $25 ^\circ\text{C}$  下缓慢振荡 ( $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 游离 8 h。酶液成分为 2% 纤维素酶 (Calbiochem, USA), 0.5% 离析酶 (Calbiochem, USA),  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  2 - (N - 吗啡) 乙基磺酸 (MES),  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘露醇,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 5.8。酶解后的混合物经 100 目的不锈钢网过滤, 滤液用  $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  转速离心 5 min, 用 CPW 21S ( $0.272 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $101 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ ,  $1\,480 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $246 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KI}$ ,  $0.025 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 21% 蔗糖) 悬浮沉淀。离心收集原生质体。原生质体用洗液 ( $9.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ ,  $18.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ ,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖, pH 5.8) 洗 2 次, 将密度调至每毫升  $1 \times 10^7$  个原生质体, 备用。

原生质体融合采用聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 融合法, 按照 Glimelius 等 (1986) 的方法进行, 略作修改。步骤如下: 首先把 3 种来源不同的细胞以 1:1:1 比例混合, 在直径为 6 cm 的无菌塑料培养皿中滴入 7 滴混合原生质体溶液, 静置 10 min, 使原生质体沉积在培养皿底部; 从原生质体混合液的正中央滴入同体积的 40% PEG 溶液, 静置 10 min, 倾斜培养皿去掉 PEG 和洗涤混合液; 随后加入 2 mL 6.7% 的 PEG 溶液, 静置 5 min, 同样去掉培养皿中的混合液; 再用改良的 K8p (Glimelius et al., 1986) 培养基洗涤融合细胞 2 次后, 加 2 mL 改良的 K8p 培养基添加  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA,  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  激动素 (kinetin), 用封口膜封闭, 在  $25 ^\circ\text{C}$  的培养箱里暗培养。

## 1.3 原生质体培养及植株再生

亲本原生质体和融合细胞采用了以下两种细胞培养方法。第 1 种, 每皿加入 2 mL 培养基, 在  $25 ^\circ\text{C}$  暗培养, 每周加 0.5 mL 新鲜培养液。培养开始后每天观察细胞的分裂和生长状况。待细胞完成几次分裂后, 移于弱光 ( $200 \text{ lx}$ ) 下培养, 当培养皿中出现肉眼可见的愈伤组织时, 将愈伤组织连同液体培养基一起转移到芽诱导培养基上, 同时转为正常光照培养。第 2 种, 细胞经液体培养 3 ~ 7 d, 当细胞分裂至 8 ~ 10 细胞时, 将分裂的细胞用 0.15% 琼脂糖包埋。包埋时先把灭菌的 0.3% 的琼脂糖 (保持  $37 ^\circ\text{C}$ ) 和 2 倍 Kao (Kao & Michcharyluk, 1975) 基本培养基 +  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖 +  $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  玉米素 (zeatin) +  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin 混合均匀, 然后用灭菌的滴管取 2 mL 混合液, 轻轻加入到培养细胞的培养皿上, 混合时轻轻摇晃培养皿, 促使溶液半固体化, 然后再封口, 在  $25 ^\circ\text{C}$  培养箱里暗培养。培养 20 ~ 30 d 以后, 2 ~ 3 mm 的细胞团出现时, 转移到 3 种固体分化培养基 MS +  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; MS +  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; MS +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA ( $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, pH 5.6 ~ 5.8), 诱导不定芽分化。同时转为正常光照培养。

切取 3 cm 左右的不定芽接种到生根培养基 ( $1/2\text{MS} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA) 诱导生根, 将生根植株移栽到塑料花盆, 在温室条件下培养。

## 1.4 杂种植株鉴定

### 1.4.1 再生植株的形态学观察

主要对再生植株的株形、叶形、抽薹习性进行观察,并与亲本进行比较,鉴定体细胞杂种。

### 1.4.2 DNA 提取与 PCR 鉴定杂种植株的细胞质雄性不育特性

取亲本和 96 株再生植株的幼叶,利用 CTAB 法(Doley & Doyle, 1990)提取和纯化植物总 DNA。为了检测细胞质雄性不育特性,利用 Ogura CMS 特异性引物 5'-GTCGTTATCGACCTCGCAAGG-3' 和 5'-GTCAAAGCAATTGGGTTCAC-3' (Sigareva & Earle, 1997) 进行了 PCR 扩增。PCR 扩增程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 51 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.4.3 染色体计数与基因组原位杂交

染色体制备与 DNA 探针: 选取 96 株再生植株的根尖,用 0.002 mol · L<sup>-1</sup> 8-羟基喹啉室温处理 1 h,用卡诺溶液(冰醋酸:乙醇 = 1:3)固定 24 h,然后转到无水乙醇,在 4 °C 保存至少 24 h。根尖体细胞染色体采用酶解去壁低渗法制备(Lian et al., 2011),在相差显微镜下观察,或用碘化丙啶(Propidium iodide, PI)染色之后在荧光显微镜下观察。使用试剂盒(Dig-Nick-Translation Mix, Roche)提取大白菜、叶用芥菜、青花菜基因组 DNA,采用缺口平移法对 3 种融合亲本 DNA 进行 dig-11-dUTP 标记,用作探针。

基因组原位杂交(Genomic in situ hybridization, GISH)程序主要参照 Leitch 等(1994)的方法进行。将准备好的染色体制片于 65 °C 的烘箱中烘 45 min,然后每张制片加 100 μL 70% 的甲酰胺,盖上盖玻片,放入 85 °C 的烘箱 2 min,迅速拿出,去掉盖玻片,立即用 70%、90% 和 100% 的冷乙醇依次脱水 5 min,最后制片自然晾干。将 20 μL 预变性的杂交混合液加到每一张制片上,然后在 85 °C 下共变性 2 min,最后将制片置于杂交盒内,于 37 °C 培养箱中杂交过夜。杂交后的制片依次在 20% 甲酰胺、2 × SSC、1 × SSC、1 × PBS 中洗脱后,每张加 100 μL 异硫氰酸荧光素(FITC)或德克萨斯红,盖上封口膜,继续在保温皿里 37 °C 反应 1 h。取出制片,揭掉封口膜,经 1 × PBS 洗脱后,每张制片加 13 μL 碘化丙啶或 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4'-6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染液,抗淬灭剂封片,用荧光显微镜观察。

### 1.4.4 扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)分析

AFLP 指纹分析主要依照 Vos 等(1995)的程序。首先将 15 μL 的酶切体系(5 U *EcoR* I、3 U *Mse* I 和 50 ng DNA)先后在 37 °C 水浴中处理 8 h 和在 65 °C 水浴中处理 1 h,再向酶切产物中加入 1 μL *T4* (1 U) 连接酶和各 1 μL *EcoR* I 接头和 *Mse* I 接头,并在 16 °C 处理过夜,然后将连接产物 70 °C 灭活并稀释 5 倍作为预扩 DNA 模板。预扩产物稀释 30 倍作为选扩的 DNA 模板。选扩的产物依照 Bassam 等(1991)报道的银染法进行多态性展示,读取长度在 80 ~ 1 000 bp 的清晰扩增片段。

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质的分离、融合、培养与植株再生

材料在 2% 纤维素酶和 0.5% 离析酶溶液中处理 16 h,可观察到细胞质壁分离、原生质体裸露的现象(图 1, A)。原生质体经分离、纯化后,用 40% PEG 诱导融合时融合率较高,显微镜观察发现大部分细胞之间发生融合。培养 2 ~ 7 d,融合细胞发生第 1 次分裂;培养 10 d 左右细胞分裂成小细胞团(图 1, B),细胞分裂处于 8 ~ 10 细胞时期。培养过程中显微镜观察发现,融合细胞液体培养时,发生培养液变黄甚至褐化。与此相反,用 0.15% 琼脂糖包埋处理的,细胞培养液未发生褐化,

细胞分裂与生长均旺盛。

融合细胞在琼脂糖半固体培养基中培养 35 d 后, 形成了大量 2~3 mm 大小的细胞团或肉眼可见的小愈伤组织 (图 1, C)。两种培养方法共获得 932 个愈伤组织, 将其接种到 3 种不定芽诱导培养基, 诱导出芽 (图 1, D)。结果表明,  $MS + 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ zeatin} + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA}$  诱导培养基的不定芽分化率最高 (表 1)。



图 1 原生质体融合、培养及芽分化和再生植株形态学比较

A: 酶解与原生质体释放; B: 细胞分裂; C: 愈伤组织; D: 分化的幼芽; E: 青花菜叶型; F: 叶用芥菜的叶型; G: 大白菜的叶型; H: 再生植株叶片呈绿色, 叶缘圆齿状波纹; I、J: 再生植株叶片呈绿色, 叶缘锯齿状波纹; K: 再生植株叶片呈绿色, 叶缘钝齿状波纹; L: 再生植株叶片类似青花菜; M: 再生植株叶片类似青花菜, 但严重皱褶; N: 叶用芥菜; O: 青花菜; P: 大白菜; Q~V: 再生植株株型; W~Y: 体细胞杂交种的抽薹、开花习性。

Fig. 1 Protoplast isolation, fusion, culture and plant regeneration, and morphological comparison of putative somatic hybrids among *B. oleracea*, *B. juncea*, and *B. campestris*

A: Protoplasts released from cotyledonary tissue; B: Cell division; C: Microcalli on the shoot induction medium; D: Plant regeneration from calli; E - G: Leaves of three fusion parents of *B. oleracea*, *B. juncea*, *B. campestris* (from left to right); H - K: Leaves of somatic hybrids with intermediate leaves; L: Broccoli like leaves; M: Curly leaves; N: A young plant of *B. juncea* (Leaf mustard); O: *B. oleracea* (Broccoli); P: *B. campestris* (Chinese cabbage); Q - V: Putative somatic hybrids with various morphologies produced among three parents of *B. oleracea*, *B. campestris* and *B. juncea*; W - Y: Bolting behaviors of putative somatic hybrids.

表 1 不同种类和浓度植物生长调节剂对不定芽诱导的影响  
Table 1 Effects of plant growth regulators on plant regeneration from protoplast fusion derived calli

芽诱导培养基 Shoot induction medium (SIM)	愈伤数 Number of callus	植株再生率/% Plant regeneration frequency
SIM1 (5 mg · L <sup>-1</sup> zeatin + 2 mg · L <sup>-1</sup> IAA)	311	24.12
SIM2 (2 mg · L <sup>-1</sup> zeatin + 2 mg · L <sup>-1</sup> IAA)	310	5.14
SIM3 (0.5 mg · L <sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg · L <sup>-1</sup> NAA)	311	1.61

大白菜、青花菜、叶用芥菜的原生质体单独培养时发现，培养 2~7 d，大白菜原生质体没有发生分裂，青花菜和叶用芥菜的原生质体个别发生第 1 次分裂；培养 10 d 后观察，3 种亲本细胞单独培养没有发生进一步的分裂，最终未能获得再生植株。

2.2 形态学观察

在温室培养条件下，再生植株长势旺盛。亲本植株与再生植株叶形的比较见图 1。

青花菜的叶片呈椭圆形，蓝绿色，叶缘锯齿状，有叶耳，叶面光滑无毛，叶柄窄（图 1，E）；叶用芥菜和大白菜叶片卵圆形，绿色，叶缘波纹型，无叶耳，叶面有被毛，叶柄宽（图 1，F、G）。再生植株叶片基本分为 4 种类型：

第 1 种，叶片呈绿色，叶缘圆齿状波纹，有叶耳，叶片皱褶，叶柄宽，叶脉与大白菜相似，叶面有被毛（图 1，H~J）。

第 2 种，叶片呈绿色，叶缘钝齿状波纹，有叶耳，叶片皱褶，叶柄窄，叶脉中间型，叶表面无被毛，但有蜡层（图 1，K）。

第 3 种，叶片类似青花菜（图 1，L）。

第 4 种，叶片蓝绿色，叶缘圆齿状波纹，无叶耳，叶片严重皱褶，叶脉类似青花菜，叶表面无被毛，但有蜡层（图 1，M）。

总之，再生植株的叶片形态、颜色、叶毛的有无等呈现多样性分布。除此之外，再生植株的叶片厚度、叶表面覆盖的蜡粉或蜡层、绒毛特征有很大的差异。

亲本植株和再生植株的株型差异较大（图 1，N~V）。再生植株分为 4 种基本株型：

第 1 种，植株的表型介于青花菜与叶用芥菜之间（图 1，Q、R）。

第 2 种，植株的表型介于青花菜和大白菜之间（图 1，S、T）。

第 3 种，植株表型独特、典型的 3 种融合杂交后代的表型（图 1，U）没有 1 株具有大白菜或叶用芥菜的表型。

第 4 种，植株的表型类似青花菜（图 1，V）。

经过 2 个多月的生长，多数的再生植株未经春化处理就开始抽薹，类似青花菜，但是其亲本芥菜、大白菜并不抽薹。大白菜和叶用芥菜经过春化处理之后开始抽薹，其形态类似青花菜（图 1，W）；分支、松散的总状花序；抽薹开花时期也不同。再生植株的抽薹、分支与花序比较多样（图 1，X、Y）。

花的形状、大小和颜色也呈现多样性（表 2），花色有亮黄、黄色、淡黄色、黄花带白色条纹。雌蕊和雄蕊的比例也呈现多样性，雄蕊/雌蕊 > 1，雄蕊/雌蕊 ≈ 1，或雄蕊/雌蕊 < 1，此外，两株植株没有雄蕊。花瓣呈圆形、圆形带褶皱、椭圆形等。96 株 16 种再生植株中，3 株产生花粉、其他均无花粉。



表 2 再生植株花器的形态比较  
Table 2 Characterization of somatic hybrids plants derived from fusion within *B. campestris*, *B. juncea*, and *B. oleracea* based on floral trait

植株种类 Type of plant	花色 Flower color	雄蕊长度/雌蕊长度 Stamen length/pistil length	花瓣形态 Shape of petals	花粉 Pollen
1	亮黄色 Blight yellow	≈ 1	圆形 Round	无 Empty
2	淡黄色 Light yellow	≈ 1	圆形 Round	无 Empty
3	黄色 Yellow	≈ 1	圆形 Round	无 Empty
4	亮黄色 Blight yellow	> 1	圆形，卷曲 Round, curly	无 Empty
5	淡黄色 Light yellow	≈ 1	圆形 Round	无 Empty
6	亮黄色 Blight yellow	≈ 1	圆形 Round	无 Empty
7	亮黄色 Blight yellow	≈ 1	椭圆形 Oval	有 Full
8	黄色 Yellow	< 1	长椭圆形 Narrow oval	无 Empty
9	淡黄色 Light yellow	< 1	长椭圆形 Narrow oval	无 Empty
10	黄色 Yellow	无雄蕊 No stamens	圆形 Round	无 Empty
11	亮黄色 Blight yellow	无雄蕊 No stamens	椭圆形 Oval	无 Empty
12	亮黄色 Blight yellow	≈ 1	椭圆形 Oval	无 Empty
13	黄色 Yellow	≈ 1	椭圆形，有斑点花瓣 Spotted petal	无 Empty
14	亮黄色 Light yellow	≈ 1	椭圆形，有斑点花瓣 Spotted petal	无 Empty
15	黄色 Yellow	≈ 1	圆形 Round	有 Full
16	亮黄色 Blight yellow	≈ 1	圆形 Round	有 Full

2.3 再生植株CMS特性鉴定

用 PCR 方法扩增线粒体 DNA 的 Ogura CMS 特异性区域，结果显示 96 株再生植株中 93 株显示了 0.5 kb 特异性条带，3 株未显示特异性条带。这表明 CMS 特性成功地转入到再生植株中。图 2 为 12 株杂种细胞及亲本植株的 PCR 分析结果，除 8 号外均有 0.5 kb 特异性条带。

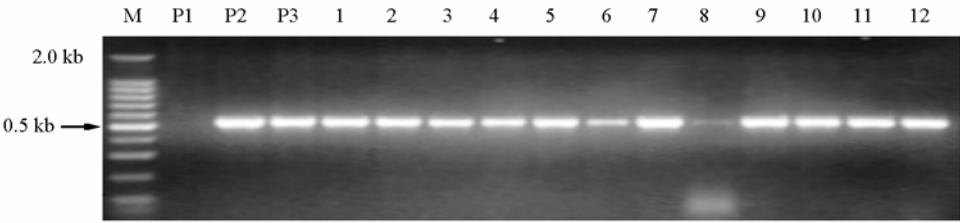


图 2 杂种细胞及其双亲植物的 PCR 分析  
M: Marker; P1: 叶用芥菜; P2: 青花菜; P3: 大白菜; 1~12: 体细胞杂交种。

Fig. 2 PCR analysis with mitochondria CMS - specific primers  
M: Marker; P1: *B. juncea* (Leaf mustard); P2: *B. oleracea* (Broccoli); P3: *B. campestris* (Chinese cabbage); 1 - 12: Somatic hybrids with CMS specific band.

2.4 染色体计数与基因组原位杂交

2.4.1 染色体计数

选取 96 株再生植株的根尖，进行染色体数的测定。显微观察发现，再生植株的染色体数为  $2n = 38 \sim 64$  (图 3, A ~ F)。根据染色体数可将再生植株分成 5 种类型。第 1 种，包括 5 株，染色体数为  $2n = 38$  (图 3, A)，与大白菜和青花菜的染色体数总和相一致。第 2 种，包括 5 株，染色体数为  $2n = 54$  (图 3, B)，与叶用芥菜和青花菜的染色体数总和相一致，其中包括 3 株没有显示 CMS 特异性条带的植株。第 3 种，包括 30 株，染色体数表现出多态性，变化范围为  $2n = 46 \sim 48$  (图 3, C)。第 4 种，包括 44 株，染色体数为  $2n = 50 \sim 58$  (不包括 54 条，图 3, D、E)。第 5 种，包括 12 株，染色体数为  $2n = 64$ ，大于任何两个亲本的染色体数的总和，但是小于 3 个亲本的染色体数的总和 (图 3, F)。

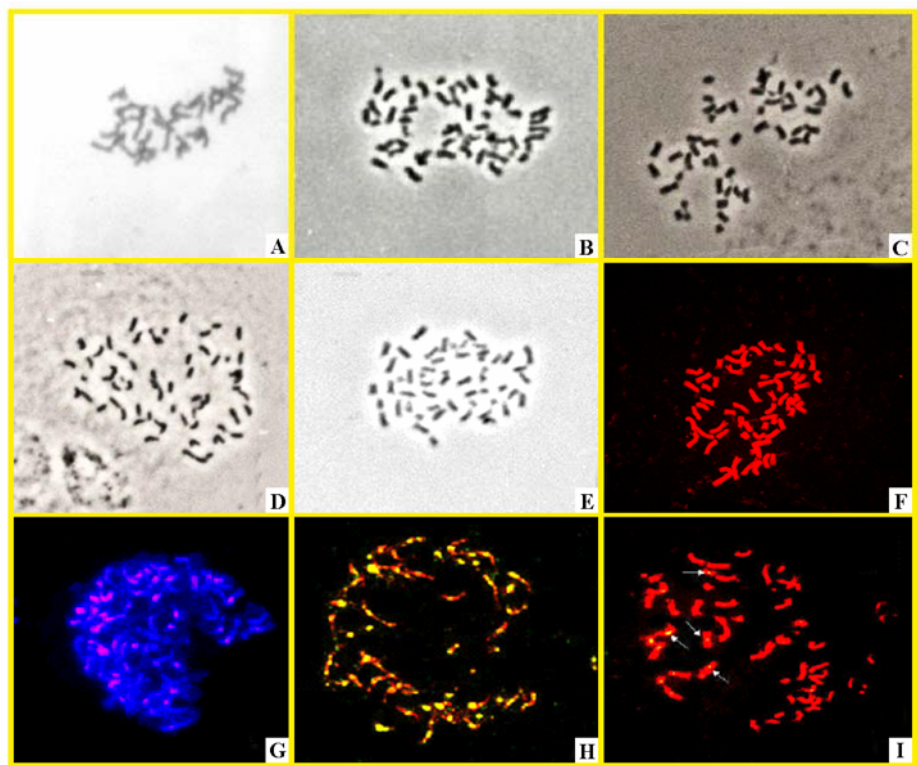


图 3 体细胞染色体数与基因组原位杂交分析

A: 再生植株染色体  $2n = 38$ ; B: 再生植株染色体  $2n = 54$ ; C: 再生植株染色体  $2n = 48$ ; D: 再生植株染色体  $2n = 56$ ;  
E: 再生植株染色体  $2n = 52$ ; F: 用碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 染色的再生植株染色体  $2n = 64$ ;  
G: 以叶用芥菜基因组 DNA 为探针的再生植株染色体; H: 以大白菜基因组 DNA 为探针的再生植株染色体; I: 以青花菜基因组 DNA 为探针的再生植株染色体 (箭头表示探针信号)。

Fig. 3 Chromosomes of cells of a root tip in somatic hybrids and genomic in situ hybridization

A:  $2n = 38$ ; B:  $2n = 54$ ; C:  $2n = 48$ ; D:  $2n = 56$ ; E:  $2n = 52$ ; F: Mitotic cells of somatic hybrids, counterstained by propidium iodide (PI)  $2n = 64$ ; G: GISH analysis of somatic hybrids in *Brassica* species using *B. juncea* probe (pink signals);  
H: Somatic using *B. campestris* (yellow); I: GISH analysis of somatic hybrids in *Brassica* species using *B. oleracea* probe (yellow signals).

2.4.2 基因组原位杂交

为鉴定再生植株的体细胞杂交特性,提取、纯化大白菜、青花菜、叶用芥菜总 DNA,直接标记成探针,与 4 型、5 型染色体数的再生植株染色体进行 GISH 分析。如图 3, G ~ I 所示,再生植株分别显示了探针 DNA 的信号。以叶用芥菜 DNA 为探针的染色体上均有叶用芥菜的信号(图 3, G; 显示为粉红色);以大白菜 DNA 为探针的染色体上均有大白菜的信号,而且分布很广(图 3, H, 显示为黄色);但以青花菜 DNA 为探针的染色体上部分显示青花菜的信号(图 3, I; 显示为黄色)。由此看来,染色体数为 50 条以上的再生植株是 3 种细胞的杂交种。

2.5 AFLP分析

试验对根据形态学特征分类的 16 种再生植株进行 AFLP 分析,读取长度在 80 ~ 1 000 bp 的清晰扩增片段(图 4)。大白菜(1 000 bp、900 bp、580 bp)、青花菜(400 bp、380 bp)、叶用芥菜(700 bp、500 ~ 400 bp)分别显示 19 条、17 条、20 条特异性条带(表 3)。再生植株均含有大白菜、青花菜、叶用芥菜带型(除 3 号以外),证明再生植株均为体细胞杂交种。APLP 检测结果显示,再生植株显示了约 450 bp 大小的,融合亲本所没有的新增条带(图 4)。



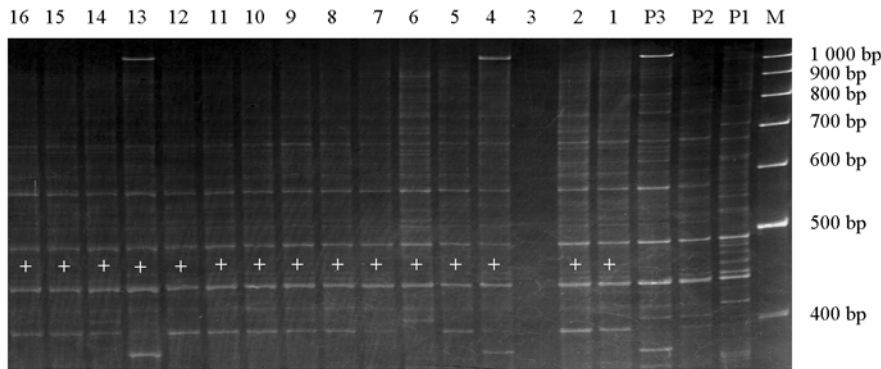


图 4 大白菜、青花菜、叶用芥菜和体细胞杂交种 AFLP 分析

P1: 叶用芥菜; P2: 青花菜; P3: 大白菜; 1~16: 体细胞杂交种; “+”表示新增条带。

Fig. 4 Representative AFLP profiles in somatic hybrids among *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. campestris* and fusion parents  
M: Marker; P1: *B. juncea*; P2: *B. oleracea*; P3: *B. campestris*; 1 - 16: Putative somatic hybrids; “+”: New bands in hybrids.

表 3 大白菜、青花菜、叶用芥菜体细胞杂交种 AFLP 分析

Table 3 AFLP analysis of somatic hybrids among *B. campestris*, *B. oleracea* and *B. juncea*

植株 Plant	叶用芥菜特 异带 (%) Specific bands of P1	青花菜特异 带 (%) Specific bands of P2	大白菜特异 带 (%) Specific bands of P3	3 种融合 亲本带 (%) Bands of P1 + P2 + P3	叶用芥菜 + 青 花菜带 (%) Bands of P1 + P2	青花菜 + 大 白菜带 (%) Bands of P2 + P3	叶用芥菜 + 大 白菜带 (%) Bands of P1 + P3	新增带 (%) New bands	总带数 Total bands
P1	19 (19.4)	0 (0)	0 (0)	33 (33.7)	25 (25.5)	0 (0)	21 (21.4)	0 (0)	98
P2	0 (0)	17 (19.3)	0 (0)	33 (37.5)	25 (28.4)	13 (14.8)	0 (0)	0 (0)	88
P3	0 (0)	0 (0)	20 (23.0)	33 (37.9)	0 (0)	13 (14.9)	21 (24.1)	0 (0)	87
H1	7 (9.1)	4 (5.2)	12 (15.6)	16 (20.8)	10 (13.0)	4 (5.2)	10 (13.0)	14 (18.2)	77
H2	7 (10.3)	6 (8.8)	7 (10.3)	10 (14.7)	11 (16.2)	7 (10.3)	8 (11.8)	12 (17.6)	68
H3	4 (5.3)	10 (13.2)	8 (10.5)	14 (18.4)	12 (15.8)	6 (7.9)	8 (10.5)	14 (18.4)	76
H4	5 (8.1)	5 (8.1)	7 (11.3)	13 (21.0)	10 (16.1)	6 (9.7)	6 (9.7)	10 (16.1)	62
H5	5 (7.4)	6 (8.8)	6 (8.8)	11 (16.2)	14 (20.6)	4 (5.9)	10 (14.7)	12 (17.6)	68
H6	7 (9.2)	7 (9.2)	10 (13.2)	15 (19.7)	11 (14.5)	5 (6.6)	11 (14.5)	10 (13.2)	76
H7	6 (8.0)	3 (4.0)	10 (13.3)	10 (13.3)	15 (20.0)	6 (8.0)	11 (14.7)	14 (18.7)	75
H8	6 (8.1)	5 (6.8)	8 (10.8)	18 (24.3)	10 (13.5)	6 (8.1)	8 (10.8)	13 (17.6)	74
H9	6 (8.8)	4 (5.9)	7 (10.3)	11 (16.2)	13 (19.1)	3 (4.4)	9 (13.2)	15 (22.1)	68
H10	10 (10.9)	8 (8.7)	10 (10.9)	15 (16.3)	14 (15.2)	5 (5.4)	11 (12.0)	19 (20.7)	92
H11	12 (14.6)	6 (7.3)	8 (9.8)	13 (15.9)	10 (12.2)	7 (8.5)	7 (8.5)	19 (23.2)	82
H12	10 (12.8)	6 (7.7)	8 (10.3)	12 (15.4)	12 (15.4)	7 (9.0)	10 (12.8)	13 (16.7)	78
H13	9 (12.7)	6 (8.5)	6 (8.5)	16 (22.5)	12 (16.9)	5 (7.0)	8 (11.3)	9 (12.7)	71
H14	12 (9.9)	9 (7.4)	11 (9.1)	23 (19.0)	21 (17.4)	12 (9.9)	16 (13.2)	17 (14.0)	121
H15	9 (8.3)	6 (5.5)	13 (11.9)	21 (19.3)	16 (14.7)	12 (11.0)	13 (11.9)	19 (17.4)	109
H16	8 (7.0)	13 (11.3)	11 (9.6)	26 (22.6)	8 (15.7)	6 (5.2)	14 (12.2)	19 (16.5)	115

注: P1: 叶用芥菜 (*B. juncea*) ; P2: 青花菜 (*B. oleracea*) ; P3: 大白菜 (*B. campestris*) ; H: 体细胞杂交种 (Somatic hybrids)。  
Note: P1: Leaf mustard (*B. juncea*) ; P2: Broccoli (*B. oleracea*) ; P3: Chinese cabbage (*B. campestris*) ; H: Somatic hybrids.

3 讨论

3.1 原生质的分离、融合、培养与植株再生

原生质体融合是拓宽芸薹属蔬菜遗传基础和丰富遗传多样性的重要途径之一。试验以大白菜、叶用芥菜、青花菜的子叶与下胚轴为材料,分离原生质体,用 40% PEG 诱导细胞融合,获得种间体细胞杂交种。为了有效防止细胞培养中发生的褐化,试验中采用了半固体琼脂糖包埋培养方法。当细胞分裂至 8~10 细胞时,用 0.15% Seaplaque 琼脂糖包埋细胞,它可赋予细胞生存能力;固定细胞分裂所必须的次生代谢物 (Brodellius & Nilsson, 1980);可隔离已衰老、死亡的细胞,或其分泌的

毒性物质, 有效防止培养基污染, 保证邻近健康细胞的分裂与生长 (Lörz et al., 1983)。

3 种亲本细胞单独培养时未能获得再生植株, 而融合细胞进行培养获得 96 株再生植株。这可能与 3 种原生质体融合后发生再生互补现象有关。小麦体细胞杂交研究中曾报道过体细胞杂交种的植株再生互补现象 (Xia et al., 2003)。

### 3.2 形态学观察

根据叶型 (颜色、厚度、叶表面蜡粉或蜡层、绒毛)、花型 (大小、颜色)、株型等形态学特征, 将 96 株再生植株分成 16 种。96 株再生植株, 在形态上明显区别于其融合亲本, 大多数的再生植株具有形态学上的混合特征。其中有些再生植株特性为大白菜与青花菜的中间型; 有些为叶用芥菜与青花菜的中间型; 有些再生植株均具有 3 种亲本的特性。在温室条件下, 再生植株长势旺盛、未见生长异常、不良的个体。再生植株的育性调查结果显示, 96 株再生植株中, 仅 3 株有花粉, 它们在 PCR 鉴定中都未显示 0.5 kb 特异性条带, 其他均无花粉。

### 3.3 再生植株CMS特性鉴定

线粒体 CMS 特异性区域的扩增结果显示, 96 株再生植株中, 93 株具有 CMS 特异性条带, 3 株没有显示 CMS 特异性条带, 这与再生植株育性调查结果相一致。Akagi 等 (1995) 采用这种方法在水稻原生质体再生植株的早期, 筛选出不育植株。Sigareva 和 Earle (1997) 也采用这种技术从花椰菜和大白菜细胞质雄性不育融合体中筛选出不育杂交后代。PCR 分析结果显示, 3 种体细胞融合可实现优良性状的高效转移, 如 CMS 特性。

### 3.4 染色体计数

再生植株的细胞学分析发现, 96 株, 16 种再生植株的染色体数变异比较广泛。只有 1 种染色体数相当于大白菜和青花菜的染色体数总和 ( $2n = 38$ ); 14 种再生植株染色体数为  $2n = 44 \sim 54$ ; 1 种染色体数是  $2n = 64$ , 大于任何两种亲本的染色体数的总和, 小于 3 种亲本染色体数的总和; 试验中未获得与 3 种亲本染色体数总和相一致的杂交种。染色体数的鉴定结果与形态学特性比较结果相一致, 进一步证实了通过 3 种细胞融合可获得多样的种质资源。

植物细胞的遗传信息定位在 3 个遗传上相互独立的区域: 细胞核、线粒体和叶绿体。它们三者相互作用共同对植物体生长发育起作用, 在长期的共同进化中它们相互作用达到平衡 (Takebe & Melchers, 1971)。通过细胞融合, 可同时转移细胞核和细胞质基因, 使融合亲本细胞质基因和核基因在杂种细胞中共存或重组, 从而产生多种多样的, 有性杂交无法实现的作物新类型 (Xiao et al., 2009)。试验中获得的再生植株染色体数变异比较广泛, 这表明 3 种原生质体融合细胞可能发生染色体重组、重排; 并且在细胞培养、分裂、分化中发生了染色体丢失。曾有研究报道体细胞杂交种的染色体丢失现象 (Sundberg & Glimelius, 1991; Forsberg et al., 1998; Du et al., 2009)。染色体丢失机制目前还不是十分清楚, 可能为 (1) 融合亲本染色体组细胞周期不同导致细胞分裂的不同步, 使得一方的染色体被丢失 (Gupta, 1969; Finch, 1983; Sybenga, 1992), 或者核蛋白质合成不同步导致落后的染色体丢失 (Laurie & Bennett, 1989); (2) 纺锤丝异常, Subrahmanyam 和 Kasha (1973) 认为是杂种细胞分裂时形成多极纺锤体引起染色体丢失; (3) 杂种细胞中双亲染色体在间期和中期的染色体分布区域不同, 随合子的发育这种区域分布会逐渐消失 (Finch & Bennett, 1983; Linde-Lursen & Bothmer, 1988); (4) 着丝粒钝化, 被丢失的染色体不能和纺锤体正确相连, 从而使得分裂时染色体丢失 (Kim et al., 2002; Mochida et al., 2004)。试验中杂交种的细胞质中线粒体、叶绿体共存或重组以及其分子机理有待进一步探究。

### 3.5 基因组原位杂交

GISH 技术是鉴定远缘杂交种中外源染色体的一种强有力的分析手段 (Schwarzacher et al., 1989; Bennett et al., 1992), 与分子生物学鉴定方法相比较, GISH 鉴定更直观、准确, 不仅能鉴定出外源染色体是否转入到杂交种中, 而且可鉴定出具体转入的染色体条数及其位置。试验分别以大白菜、青花菜与叶用芥菜的基因组 DNA 为探针进行 GISH 分析, 结果显示染色体数超过  $2n = 50$  的再生植株均有 3 种 DNA 片段的荧光信号, 因此这些再生植株可能是 3 种体细胞融合产物。以 AB 基因组为探针时, 再生植株染色体上的杂交信号强、分布广泛; 以 A 基因组为探针时, 同样杂交荧光信号强、分布在所有染色体上; 然而, 以 C 基因组为探针时, 虽然杂交荧光信号强, 但信号分布在少数染色体上。这可能与再生植株的染色体由 AB、A、C 基因组重组、重排有关。

### 3.6 AFLP 分析

AFLP 标记是选择性扩增基因组 DNA 酶切片段所产生的扩增产物的多态性, 可有效地应用于体细胞杂种鉴定 (Brewer et al., 1999)。试验中 AFLP 结果显示, 再生植株显示了 3 种亲本的特异性条带、2 种亲本的特异性条带和新增条带。这说明再生植株是 3 种亲本融合产生的体细胞杂交种, 杂交种中新增带的出现进一步说明 3 种融合亲本基因组之间发生了重组。

试验利用大白菜、青花菜与叶用芥菜原生质体融合获得了再生植株, 通过形态学比较及 PCR, 染色体数的观察, GISH 和 AFLP 等技术鉴定了体细胞杂交种的基因组相互作用, 并筛选、获得了一批具有育种利用价值的芸薹属蔬菜新种质资源——3 种远缘种之间的体细胞杂交种。利用体细胞杂交种可进行持续回交, 产生更广泛的、更有应用潜力的种质资源, 从而达到育种目标。

## References

- Akagi H, Taguchi T, Fujimura T. 1995. Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion. *Theor Appl Genet*, 91: 563 – 567.
- Bassam B, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 196: 80 – 83.
- Bennett S T, Kenton A Y, Bennett M D. 1992. Genomic in situ hybridization reveals the allopolyploid nature of *Milium ontianum* (Gramineae). *Chromosoma*, 101: 420 – 424.
- Brewer E P, Saunders J A, Angle J S, Chaney R L, McIntosh M S. 1999. Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 99: 761 – 771.
- Brodelius P, Nilsson K. 1980. Entrapment of plant cells in different matrixes. A Comparative study. *FEBS Lett*, 122, 312.
- Cardi T, Earle E D. 1997. Production of new CMS *Brassica oleracea* by transfer of “Anand” cytoplasm from *B. rapa* through protoplast fusion. *Theor Appl Genet*, 94: 204 – 212.
- Doyle J J, Doyle J I. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 – 15.
- Du X Z, Ge X H, Yao X C, Zhao Z G, Li Z Y. 2009. Production and cytogenetic characterization of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* and backcross progenies. *Plant Cell Rep*, 28: 1105 – 1113.
- Finch R A, Bennett M D. 1983. The mechanism of somatic chromosome elimination in *Hordeum* // Brandham P E. Key Chromosome Conference II: Proceedings of the Second Chromosome Conference. London: Allen & Unwin: 146 – 153.
- Finch R A. 1983. Tissue-specific elimination of alternative whole parental genomes in one barley hybrid. *Chromosoma*, 88: 386 – 393.
- Forsberg J, Dixelius C, Lagercrantz U, Glimelius K. 1998. UV dose-dependent DNA elimination in asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 131: 65 – 76.
- Glimelius K, Mats D, Hugo F F. 1986. Selection and enrichment of plant protoplast herokaryons of *Brassicaceae* by flow sorting. *Plant Sci*, 45: 133 – 141.
- Gupta S B. 1969. Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana glauca* and a hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. *Can J Genet Cytol*, 11: 133 – 142.
- Kao K N, Michcharyluk M R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplast at very low population density in

- liquid media. *Planta*, 126: 105 – 110.
- Kim N S, Armstrong K C, Fedak G, Ho K, Park N I. 2002. A microsatellite sequence from the rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) distinguishes between the centromeres of *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* in hybrid plants. *Genome*, 45: 165 – 174.
- Laurie D A, Bennett M D. 1989. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat  $\times$  maize crosses. *Genome*, 32: 953 – 961.
- Leitch A R, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch I J. 1994. Microscopy handbook No. 27 In situ hybridization: A practical guide. Bios Scientific, Oxford.
- Li A M, Wei C X, Jiang J J, Zhang Y T, Rod J, Snowdon R J, Wang Y P. 2009. Phenotypic variation in progenies from somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis alba*. *Euphytica*, 170: 289 – 296.
- Linde-Lursen I, Bothmer R von. 1988. Elimination and duplication of particular *Hordeum vulgare* chromosomes in aneuploid interspecific *Hordeum* hybrids. *Theor Appl Genet*, 76: 897 – 908.
- Lian Y J, Lim H T. 2001. Plant regeneration of *B. juncea* through plant tissue and protoplast culture. *J Plant Biotechnol*, 3: 27 – 31.
- Lian Y J, Lin G Z, Zhao X M, Lim H T. 2011. Production and genetic characterization of somatic hybrids between leaf mustard (*Brassica juncea*) and broccoli (*Brassica oleracea*). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 47: 289 – 296.
- Lörz H, Larkin P I, Thomson I, Scowcroft W R. 1983. Improvement protoplast and agarose media. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2: 217 – 226.
- Mochida K, Tsujimoto H, Sasakumat. 2004. Confocal analysis of chromosome behavior in wheat  $\times$  maize zygotes. *Genome*, 47: 199 – 205.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid grown and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473 – 497.
- Navrátilová B. 2004. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae – A review. *Hort Sci (Prague)*, 31 (4): 140 – 157.
- Prakash S, Bhat S R, Quiros C F, Kirti P B, Chopra V L. 2009. *Brassica* and its close allies: Cytogenetics and evolution. *Plant Breed Rev*, 31: 21 – 187.
- Schwarzacher T, Leitch A R, Bennett M D, Heslop-Harrison J S. 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot*, 64: 315 – 324.
- Sigareva M A, Earle E D. 1997. Direct transfer of a cold tolerant *Ogura* male sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion. *Theor Appl Genet*, 94: 213 – 220.
- Sigareva M A, Earle E D. 1999. Regeneration of plants from protoplasts of *Capsella bursa-pastoris* and somatic hybridization with rapid cycling *Brassica oleracea*. *Plant Cell Rep*, 18: 412 – 417.
- Snowdon R J, Lühs W, Friedt W. 2006. Oilseed rape // Kole C. Genome mapping and molecular breeding, vol 2: Oilseeds. Heidelberg: Springer Verlag: 55 – 114.
- Subrahmanyam N C, Kasha K J. 1973. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. *Chromosoma*, 42: 111 – 125.
- Sundberg E, Glimelius K. 1991. Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within Brassicaceae. *Theor Appl Genet*, 83: 81 – 88.
- Sybenga J. 1992. Cytogenetics in plant breeding. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Takebe I, Labib Q, Melchers Q. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58: 318 – 320.
- Tanksley S D, McCouch S R. 1997. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277: 1063 – 1066.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, Lee T V D, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acid Research*, 21: 4407 – 4414.
- Wang Y P, Sonntag K, Rudloff E, Chen J M. 2005. Intergeneric somatic hybridization between *Brassica napus* L. and *Sinapis alba* L. *Journal of Integrative Plant Biology (Formerly Acta Botanica Sinica)*, 47 (1): 84 – 91.
- Wang Y P, Sonntag K, Rudloff E, Groeneveld I, Gramenz J, Chu C C. 2006. Production and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus sativus*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 86: 279 – 283.
- Xia G M, Xiang F N, Zhou A F, Wang H, Chen H M. 2003. Asymmetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Agropyron elongatum* (Host) Nevishi. *Theor Appl Genet*, 107: 299 – 305.
- Xiao W, Huang, X, Gong Q, Dai X M, Zhao J T, Wei Y R, Huang X L. 2009. Somatic hybrids obtained by asymmetric protoplast fusion between *Musa Silk* cv. Guoshanxiang (AAB) and *Musa acuminata* cv. Mas (AA), *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 97: 313 – 321.
- Yao Xing-wei, Liu Fan, Yun Xing-fu, Zhao Hong, Ryschka U, Schumann G. 2005. Interspecific hybridization between *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* and *Brassica spinescens* via asymmetric somatic protoplast fusion. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (6): 1039 – 1044. (in Chinese)
- 姚星伟, 刘 凡, 云兴福, 赵 泓, Ryschka U, Schumann G. 2005. 非对称体细胞融合获得花椰菜与 *Brassica spinescens* 的种间杂种. *园艺学报*, 32 (6): 1039 – 1044.
- Zamir D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet*, 2: 983 – 989.