

大白菜单体的鉴定及其染色体行为研究

罗双霞, 陈雪平, 申书兴*

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

摘要: 以同源四倍体大白菜小孢子植株为材料, 采用根尖染色体数鉴定的方法, 从 534 个小孢子植株中筛选出 9 株 $2n-1=19$ 的植株, 经核型分析和离体繁殖初步获得了 3 号、5 号和 6 号 3 个单体。3 个单体生殖生长期植株和花蕾形态及花粉特征与二倍体差别明显, 各单体间花蕾形态差异明显。在减数分裂终变期或中期 I, 单体染色体主要以单价体的形式存在, 后期 I 染色体以 9-10 分离为主。

关键词: 大白菜; 染色体; 单体

中图分类号: S 634.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 03-0561-06

Identification of Several Monosomics in Chinese Cabbage and Observation of Their Chromosome Behaviors

LUO Shuang-xia, CHEN Xue-ping, and SHEN Shu-xing*

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

Abstract: In the present paper, nine $2n-1=19$ plants were obtained from the 534 microspore plantlets of autotetraploid Chinese cabbage by chromosome number examination, and then three monosomic lines (mono-3, mono-5 and mono-6) were preliminary identified by karyotype analysis and propagation *in vitro*. The plant and flower bud morphological characters, pollen viability and regularity were significantly different between the three monosomics and diploid. Flower bud type among the three monosomics also occurred markedly difference. The unitary chromosome of the monosomics was mainly existed in an univalent, occasionally formed a trivalent with another pair of homologous chromosomes at diakinesis or at metaphase I, and the chromosome distribution of the monosomics was mainly 9-10 at anaphase I.

Key words: Chinese cabbage; chromosome; monosomic

单体是指比整倍体少一条染色体的个体。单体是用于基因定位和染色体工程育种的重要材料。在多倍体物种上开展单体研究的很多 (Doyle, 1986; 穆素梅 等, 1994; 张惠叶和徐兆飞, 1996; Ji & Raska, 1997; 范友年, 2000; 张香娣 等, 2000; 李振声, 2001; Irigoyen et al., 2002; Tadesse et al., 2006)。早在 1939—1945 年期间 Sears 就获得了小麦系列单体, 目前在小麦类植物中已获得了多套单体系统。二倍体物种一般很难获得单体, 因为缺少 1 条染色体对其生存影响很大。到目前为

收稿日期: 2011-12-27; **修回日期:** 2012-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270915, 39970517, 30471182); 河北省自然科学基金项目 (C2004000336); 河北农业大学将帅计划项目

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

止, 在二倍体植物上尚未见到关于单体的研究报道。

申书兴等(1999, 2006)在利用同源四倍体大白菜小孢子培养创建三体系的过程中获得了染色体数为 $2n - 1$ 的植株。本研究中对作者获得的几个大白菜 $2n - 1$ 植株进行核型分析, 同时对其减数分裂行为进行研究, 旨在为大白菜的单体利用奠定细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为大白菜 $2n - 1$ 的试管无性系, 由同源四倍体大白菜 9405 自交系 ($2n = 4x = 40$) 游离小孢子培养获得。

1.2 小孢子植株染色体数鉴定

将小孢子植株接种到 1/2MS 培养基上进行生根培养, 待根长 1.5 cm 左右时按单株分别切下根尖和茎尖并对应编号记载, 茎尖重新接种到新鲜培养基进行继代培养, 根尖用于染色体数鉴定。根尖用常规压片法制片, PIHCH 染色液(丙酸-铁-水合三氯乙醛-苏木精)染色, Olympus-BH2 显微镜下观察计数, 选择保留 $2n - 1$ 的试管株系。

1.3 单体染色体类别鉴定

采用核型分析鉴定单体染色体的类别。切取 $2n - 1$ 试管植株根尖, 置 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉水溶液预处理 2 h, 然后用 Carnoy 固定液(3 份 95% 乙醇: 1 份冰醋酸)固定。去壁低渗-火焰干燥法制片, PIHCH 染色液染色, Olympus-BH2 显微镜下观察和照相。参照李懋学和张赞平(1996)的方法进行核型分析。

1.4 不同单体形态特征与花粉活力观察

在栽培管理条件一致的情况下, 以正常二倍体为对照, 观察各个单体生殖生长期长势、花序和花蕾特征。将新鲜的花粉直接撒在载玻片上, 在 $40 \times$ 物镜下随机观察, 统计畸形花粉数和正常花粉数。以畸形花粉率表示整齐度。

用 TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑) 染色法进行花粉活力测定。经 TTC 法检测后, 有活力花粉粒被染成红色, 无活力花粉粒不着色。花粉活力 (%) = (有活力花粉数/花粉总数) \times 100。每份材料随机镜检 10 个视野计算平均值。

1.5 不同单体的减数分裂观察

于盛花期上午 9: 00—11: 00 用改良的卡诺固定液(3 份 50% 丙酸: 1 份冰醋酸)固定幼小的花蕾 48 h 以上, 再换到 70% 乙醇在冰箱中保存。常规压片法制片, PIHCH 染色液染色, Olympus-BH2 显微镜下观察照相。

2 结果与分析

2.1 单体植株的获得

对 534 个同源四倍体大白菜的小孢子植株进行染色体数鉴定, 其中二倍体和四倍体分别为 324 和 115 株, 分别占 60.67% 和 21.54%, $2n + 1$ 和 $2n + 2$ 超倍体分别为 79 和 7 株, 分别占 14.79% 和

1.31%，获得了 9 株 $2n-1$ 单体植株，占 1.69%。

2.2 单体的类别

参照李懋学和张赞平（1996）的核型分析标准，通过反复分析比较染色体相对长度、臂比、随体等特征，从 9 株 $2n-1$ 株系中鉴定出 3 个不同的单体，分别为 3 号单体、5 号单体和 6 号单体（图 1）。

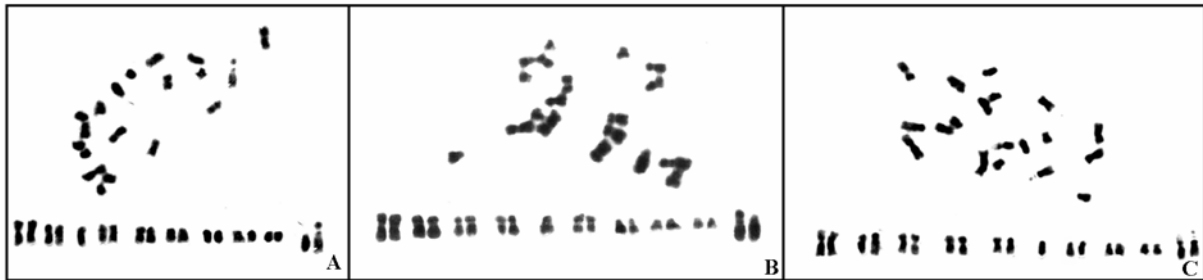


图 1 大白菜单体核型图

A: 3 号单体; B: 5 号单体; C: 6 号单体。

Fig. 1 Karyotype of monosomics of Chinese cabbage

A: Mono-3; B: Mono-5; C: Mono-6.

2.3 单体植株的长势、花蕾形态及花粉活性特征

观察鉴定发现：各个单体生殖生长期植株形态和花蕾形态及花粉特征与二倍体对照差别明显。各单体间花蕾形态差异也明显，主要特征如下。

3 号单体：生殖生长期植株倒伏，生长势很弱；花序内花蕾数少，花蕾小且多畸形，柱头外露，畸形花粉率高（73.17%），花粉无生活力，自然结籽率为零。

5 号单体：生殖生长期植株倒伏，生长势很弱；花序内花蕾数少，花蕾钝圆，畸形花粉率高（66.11%），花粉生活力低（29.10%），自然结籽率为零。

6 号单体：生殖生长期植株倒伏，生长势很弱；花序内花蕾数少，花蕾小，畸形花粉率高（62.33%），花粉生活力低（34.32%），自然结籽率为零。

2.4 单体的减数分裂行为

2.4.1 染色体的联会方式

试验中观察发现，大白菜单体的成单染色体在减数分裂终变期或中期 I 多呈单价体状态，即花粉母细胞（PMCs）染色体构型表现为 $9\text{II}+1\text{I}$ （图 2，A），或出现 3 个单价体，即为 $8\text{II}+3\text{I}$ （图 2，B），偶尔成单的染色体也会与其他同源染色体形成局部联会的三价体，即 $8\text{II}+1\text{III}$ （图 2，C）。

从表 1 可看出，3 号单体和 5 号单体的三价体频率较高，终变期三价体频率分别为 11.61% 和 12.80%，中期 I 三价体频率分别为 8.49% 和 9.57%，6 号单体的三价体频率较低，终变期为 5.77%，中期 I 为 4.39%。由此可推测大白菜不同染色体间存在部分同源的现象，且不同染色体间的同源程度不同。

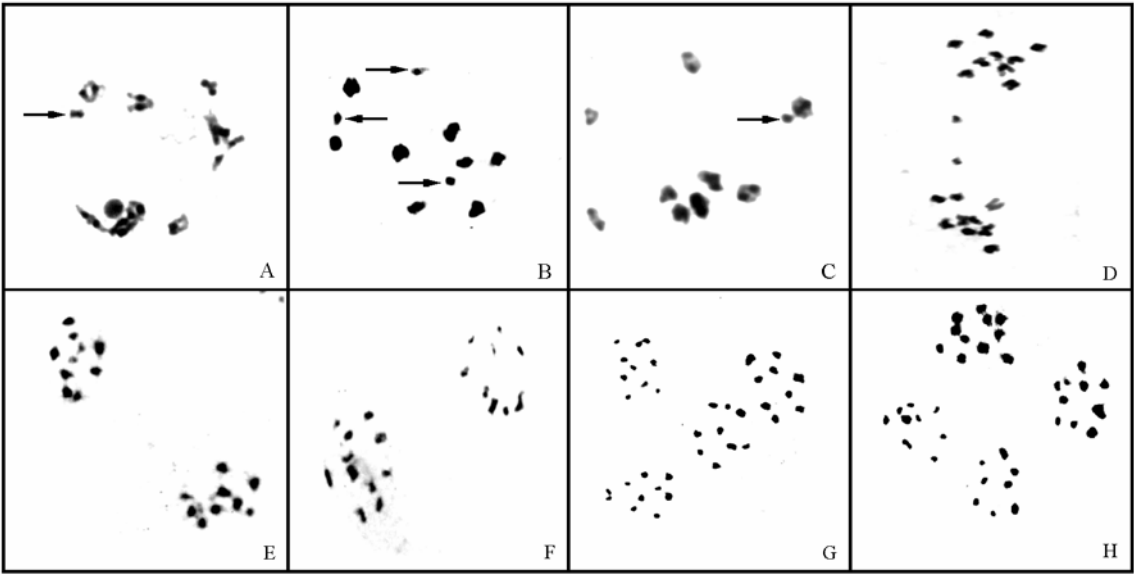


图 2 大白菜单体减数分裂

A: 终变期, 9 II + 1 I; B: 中期 I, 8 II + 3 I; C: 中期 I, 8 II + 1 III; D: 后期 I, 单价体落后并姊妹染色单体提前分离; E: 后期 I, 9-10 分离; F: 后期 I, 9-11 分离; G: 后期 II, 9-9-10-10 分离; H: 后期 II, 8-9-10-11 分离。

Fig. 2 Meiosis of monosomics of Chinese cabbage

A: 9 II + 1 I at diakinesis; B: 8 II + 3 I at metaphase I; C: 8 II + 1 III at metaphase I; D: Lagged univalent divided at anaphase I; E: Chromosome distribution of 9-10 at anaphase I; F: Chromosome distribution of 9-11 at anaphase I; G: Chromosome distribution of 9-9-10-10 at anaphase II; H: Chromosome distribution of 8-9-10-11 at anaphase II.

表 1 单体终变期、中期 I 染色体构型

Table 1 Chromosomes configuration of monosomics at diakinesis and metaphase I

单体 Monosomics	终变期 Diakinesis			中期 I Metaphase I		
	细胞总数 Cell number	具三价体细胞/% Cells with trivalent	具单价体细胞/% Cells with univalent	细胞总数 Cell number	具三价体细胞/% Cells with trivalent	具单价体细胞/% Cells with univalent
3 号单体 Mono-3	112	11.61	88.39	106	8.49	91.51
5 号单体 Mono-5	125	12.80	87.20	115	9.57	90.43
6 号单体 Mono-6	104	5.77	94.23	114	4.39	95.61

2.4.2 后期 I 染色体分离的不均衡性

后期 I, 在纺锤丝的牵引下, 配对的同源染色体开始彼此分离, 向两极移动, 单价体则随机地向两极游离, 偶见单价体落后并提前分离的现象 (图 2, D)。由于单价体向两极分离的不确定性导致后期 I 细胞两极的染色体数不均衡性, 如各单体在后期 I 染色体分离方式有 9-10 (图 2, E) 和 9-11 (图 2, F) 等, 其中以 9-10 为主要方式 (表 2)。

表 2 不同单体后期 I 和后期 II 染色体分离方式与频率
Table 2 Separation type and its frequency of chromosomes at anaphase I and II of monosomics

单体 Monosomics	后期 I Anaphase I			后期 II Anaphase II		
	细胞总数	9-10 分离比率/%	其他分离比率/%	细胞总数	9-9-10-10 分离比率/%	其他分离比率/%
	Cell number	Frequency of 9-10	Frequency of other	Cell number	Frequency of 9-9-10-10	Frequency of other
3 号单体 Mono-3	111	60.36	39.64	125	45.60	54.40
5 号单体 Mono-5	113	57.52	42.48	118	49.15	50.85
6 号单体 Mono-6	118	55.08	44.92	125	44.00	56.00

2.4.3 后期 II 染色体分离的不均衡性

由于受后期 I 单价体落后或姊妹染色单体提前分离的影响，后期 II 出现了多种染色体分离方式，如 9-9-10-10（图 2，G）和 8-9-10-11（图 2，H）等。

对后期 II 每极不同染色体数的频率进行统计，由表 3 可见，染色体数为 10 的频率平均为 35.61%，其它不同染色体数出现频率之和为 64.39%。由此推断单体可形成具有正常染色体数（染色体数为 10）的花粉，但频率较低。

表 3 各单体在后期 II 每极不同染色体数出现的频率
Table 3 Number and frequency of every pole's chromosome of monosomics at anaphase II

单体 Monosomics	细胞总数 Cell number	每极染色体数出现频率/% Number and frequency of every pole's chromosome				
		8	9	10	11	12
3 号单体 Mono-3	123	3.25	62.60	32.73	0.81	0.81
5 号单体 Mono-5	118	3.38	56.78	37.30	2.54	0
6 号单体 Mono-6	106	3.77	57.55	36.79	1.89	0

3 讨论

3.1 同源四倍体大白菜小孢子培养为单体的产生提供了机会

在植物中单体一般只存在于异源多倍体中，因为异源多倍体的配子含有两个或两个以上的异源染色体组， $n - 1$ 配子虽然缺失了一个染色体组的某条染色体，但所缺失染色体的功能可以被另一个染色体组的某条染色体所补充，因此，产生的 $n - 1$ 配子一般是可育的。而在二倍体物种中则不同，因为二倍体植物的配子内只有一个染色体组，配子中一旦缺少了染色体组的某个成员，其染色体组的完整性即遭破坏，因此， $n - 1$ 配子常常没有生活力或是败育的，即使个别 $n - 1$ 配子偶尔参与了受精也不能发育成植株。因此，单体在二倍体植物中是极为罕见的。本研究中对同源四倍体大白菜小孢子培养中除获得了大量的三体、双三体植株外，还获得了部分单体植株，并鉴定出 3 个单体（3 号单体，5 号单体，6 号单体）。虽然这些单体植株的生长势差，植株弱小，但能开花而且花粉有一定活力，有的通过与二倍体人工回交亦能得到极少量种子，但自然结籽率为零。利用同源四倍体大白菜小孢子培养能产生 $2n - 1$ 的植株，是因为同源四倍体能产生 $2n - 1$ 的小孢子，这种小孢子要比 $n - 1$ 小孢子生活力强，有发育成植株的潜力，避开了 $n - 1$ 配子无能力与 n 配子受精发育成 $2n - 1$ 个体的弊端。

3.2 大白菜单体在研究物种进化中的作用

单体是研究大白菜比较基因组的珍贵材料，不但可以研究染色体间的同源性，还可以研究大白菜与近缘种之间的亲缘关系以及大白菜的起源。

大白菜有部分单体存活, 这表明大白菜对某个染色体的缺失具有很强的耐性, 由此推测在大白菜染色体组中非同源染色体之间存在着部分同源性, 也说明大白菜染色体组中存在大片段重复的可能。为证实这一推论, 对单体的减数分裂行为进行了观察研究, 发现在减数分裂终变期或中期 I 单体染色体除呈单价体外, 还有与其它染色体形成三价体的情况, 从而在细胞学水平上证实了大白菜的某些非同源染色体之间确实存在着部分同源性。

本研究中从四倍体大白菜小孢子植株中只获得了 3 个不同的单体, 说明不同染色体的缺失对大白菜生存的影响是不同的, 可能其它染色体的缺失造成配子不育, 因而无法获得整套单体系。

References

- Doyle G G. 1986. Aneuploidy and inbreeding depression in random mating and self-fertilizing autotetraploid population. *Thero Appl Genet*, 72: 799 - 806.
- Fan You-nian. 2000. Monosomes in Upland cotton-origin, transmission and identification. *Journal of Jiangnan University*, 17 (6): 4 - 7. (in Chinese)
范友年. 2000. 陆地棉单体的起源、传递和鉴定. *江汉大学学报*, 17 (6): 4 - 7.
- Irigoyen M L, Linares C, Ferrer E, Fominaya A. 2002. Fluorescence *in situ* hybridization mapping of *Avena sativa* L. cv. SunII and its monosomic lines using cloned repetitive DNA sequences. *Genome*, 45: 1230 - 1237.
- Ji Yuan-fu, Raska D A. 1997. Use of meiotic FISH for identification of a new monosome in *Gossypium hirsutum* L. *Genome*, 40: 34 - 40.
- Li Mao-xue, Zhang Zan-ping. 1996. Crop chromosome and manipulation technique. Beijing: China Agriculture 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 Zhen-sheng. 2001. Establishment of a set of blue grained wheat monosomic lines for wheat chromosome engineering studies. *Hereditas (Beijing)*, 23: 42. (in Chinese)
李振声. 2001. 用于小麦染色体工程的蓝粒小麦单体系列材料的创制. *遗传*, 23: 42.
- Mu Su-mei, Zhong Guan-chang, Li Zhen-sheng, Li Bin. 1994. Developing stable nullisomic wheat by blue grain monosomic wheat. *Eco-Agriculture Research*, 2 (3): 69 - 72. (in Chinese)
穆素梅, 钟冠昌, 李振声, 李 滨. 1994. 利用蓝粒单体小麦选育稳定缺体小麦的研究. *生态农业研究*, 2 (3): 69 - 72.
- Shen Shu-xing, Zhao Qian-cheng, Liu Shi-xiong, Zhang Cheng-he, Li Zhen-qiu. 1999. Plant regeneration from isolated microspore culture of autotetraploid Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (4): 232 - 237. (in Chinese)
申书兴, 赵前程, 刘世雄, 张成合, 李振秋. 1999. 四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定. *园艺学报*, 26 (4): 232 - 237.
- 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.
- Tadesse Wuletaw, Hsam Sai L K, Wenzel Gerhard, Zeller Friedrich J. 2006. Identification and monosomic analysis of tan spot resistance genes in synthetic wheat lines (*Triticum turgidum* L. \times *Aegilops tauschii* Coss.). *Crop Science*, 46: 1212 - 1217.
- Zhang Hui-ye, Xu Zhao-fei. 1996. Breeding and application of monosome series of wheat 12057. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 11 (3): 1 - 7. (in Chinese)
张惠叶, 徐兆飞. 1996. 12057 小麦品种单体系统的培育及应用. *华北农学报*, 11 (3): 1 - 7.
- Zhang Xiang-di, Wang Kun-bo, Li Mao-xue, Li Shao-hui, Wang Chun-ying, Song Guo-li, Liu Fang. 2000. Observing behavior of monosome and telisome chromosomes of *Gossypium hirsutum* and their identification approach. *Acta Gossypii Sinica*, 12 (6): 302 - 305. (in Chinese)
张香娣, 王坤波, 李懋学, 黎绍惠, 王春英, 宋国立, 刘 方. 2000. 陆地棉单体和端体细胞学行为与鉴定技术. *棉花学报*, 12 (6): 302 - 305.