

大白菜—结球甘蓝异源三倍体（ACC）基于25S rDNA的FISH分析

轩淑欣¹, 赵玉靖¹, 王彦华¹, 郗丽娟², 李晓峰¹, 申书兴^{1,*}

(¹河北农业大学园艺学院, 河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室, 河北保定 071001; ²河北省农林科学院经济作物研究所, 石家庄 050061)

摘要: 应用 25S rDNA-FISH 对大白菜—结球甘蓝异源三倍体（ACC）中期染色体组成和减数分裂染色体行为进行了分析, 并进行了花粉特性和结实性的研究。结果表明, 大白菜—结球甘蓝异源三倍体染色体数为 28, 含有 9 个 25S rDNA 位点, 其中 4 个来自结球甘蓝 4 号和 7 号染色体; 5 个来自大白菜 1~5 号染色体; A、C 基因组间不同染色体同源程度不同, 减数分裂终变期常形成单价体、二价体和三价体等不同的联会方式; 中期 I 和中期 II 存在游离染色体; 后期 I 和后期 II 染色体分离不均衡, 并存在染色体落后或丢失; 末期 II 有微核产生。异源三倍体花粉整齐度和生活力远低于其二倍体亲本, 自交及与亲本甘蓝（CC）回交的结籽率都极低, 仅为 0.01%。

关键词: 大白菜; 结球甘蓝; 异源三倍体; FISH

中图分类号: S 634.1; S 635.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 12-2402-09

FISH Analysis Based on 25S rDNA in Chinese Cabbage – Head Cabbage Allotriploid (ACC)

XUAN Shu-xin¹, ZHAO Yu-jing¹, WANG Yan-hua¹, QIE Li-juan², LI Xiao-feng¹, and SHEN Shu-xing^{1,*}

(¹Key Laboratory for Vegetable Germplasm Enhancement and Utilization of Hebei, College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; ²Institute of Cash Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: 25S rDNA-FISH was applied to analyze metaphase chromosome components and meiotic chromosome behavior of Chinese cabbage – head cabbage allotriploid (ACC), and pollen character and the fecundity of the allotriploid was studied. In the 25S rDNA-FISH analysis for metaphase chromosomes, Chinese cabbage – head cabbage allotriploid was verified to have 28 chromosomes and contains 9 loci of 25S rDNA, among them 4 loci mapping on chromosome 4 and 7 of head cabbage, and the other 5 loci mapping on chromosome 1 – 5 of Chinese cabbage. There was different degree of homology between A chromosomes and C chromosomes. At meiotic diakinesis, the chromosomes often form different association patterns, such as univalent, bivalent, and trivalent, etc. There were dissociated chromosomes at metaphase I and II, chromosome unequally segregating, lagging and losing at anaphase I and anaphase

收稿日期: 2014-08-11; **修回日期:** 2014-10-24

基金项目: ‘十二五’农村领域国家科技计划课题 (2012AA100102); 农业科研杰出人才培养计划项目 (2130106); 国家自然科学基金项目 (31171964); 河北省自然科学基金项目 (C2014204135)

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

II, and micronuclei forming at telophase II. These results led to that pollen regularity and pollen viability of allotriploid was much lower than that of its diploid parents. Whether this allotriploid was selfing or backcross with head cabbage, the seed setting rate was very low, only 0.01%.

Key words: Chinese cabbage; head cabbage; allotriploid; fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

异附加系是进行外源优益基因转移、基因染色体定位、物理图谱构建、染色体组间部分同源性关系等研究的重要材料 (Okagaki et al., 2001; Akaba et al., 2009; Geleta et al., 2012; Heneen et al., 2012; 董辉 等, 2013)。异附加系一般是通过两个种间的异源三倍体与其二倍体亲本回交产生, 并通过形态学、细胞学、生理生化 and 分子标记等方法鉴定获得。因此, 异源三倍体的合成是异附加系创建的必要环节。在芸薹属作物上, 利用异源三倍体为中间材料已创建了多套以白菜 (A 基因组) 为遗传背景附加甘蓝 (C 基因组) 不同染色体的异附加系, 如白菜—芥蓝异附加系 (Hasterok et al., 2005; Heneen et al., 2012)、大白菜—结球甘蓝异附加系 (刘炜 等, 2008; 顾爱侠 等, 2009; 吕文欣 等, 2011)、菜薹—芥蓝异附加系 (Wang et al., 2008; 陈雪平等, 2010) 等, 但以甘蓝 (C 基因组) 为遗传背景附加白菜 (A 基因组) 染色体的附加系报道极少。任艳蕊等 (2009) 通过四倍体芥蓝与二倍体菜薹杂交合成了芥蓝—菜薹异源三倍体 (CCA), 并以该异源三倍体 (CCA) 为种间材料, 合成了以芥蓝为遗传背景附加菜薹染色体的附加系 (任艳蕊 等, 2010; Li et al., 2013)。

结球甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*, $2n = 18$, CC) 和大白菜 (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*, $2n = 20$, AA) 分属十字花科芸薹属 C、A 二倍体基本种, 均以叶球为食用器官, 在中国蔬菜生产中占有重要地位。为创造新的种质资源, 并尝试开展以结球甘蓝为遗传背景附加大白菜染色体的附加系创建工作, 作者的研究团队开展了结球甘蓝同源四倍体与大白菜二倍体的杂交工作, 获得了大白菜细胞质背景的大白菜—结球甘蓝异源三倍体 (ACC) 新材料 (顾爱侠 等, 2008)。荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 是 20 世纪 80 年代末发展起来的一种重要的分子细胞遗传学工具, 以核糖体 RNA 基因 (rDNA) 为探针的染色体 FISH 是对染色体较小且形态相近的物种进行染色体分析的有效手段 (徐延浩 等, 2007; Kwon & Kim, 2009), 被较多地用于芸薹属染色体分析 (Fukui et al., 1998; Hasterok et al., 2001, 2005; Kulak et al., 2002; 轩淑欣 等, 2007, 2013)。本研究中利用 25S rDNA-FISH 对大白菜—结球甘蓝异源三倍体 (ACC) 进行了中期染色体组成和减数分裂染色体行为分析, 并对其花粉特征以及结实性进行了观察, 旨在为结球甘蓝—大白菜异附加系的选育及精确鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料大白菜 (AA, $2n = 2x = 20$)、结球甘蓝 (CC, $2n = 2x = 18$) 及大白菜—结球甘蓝异源三倍体 (ACC) 均由河北农业大学蔬菜遗传育种课题组提供。其中大白菜—结球甘蓝异源三倍体 (ACC) 是本课题组利用二倍体大白菜和四倍体结球甘蓝人工杂交授粉结合幼胚离体培养获得 (顾爱侠 等, 2008)。供试探针为来自拟南芥 25S rDNA 编码区的一个 2.3 kb 的亚克隆, 由波兰的 Dr. Robert Hasterok 提供。

将供试材料组培苗进行生根培养, 切取合适的根尖在 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-羟基喹啉中预处理 2 h, 然后置于卡诺固定液 (酒精: 甲醇 = 3:1) 中固定, 用于中期染色体制片; 另一部分生根组培苗于冬季栽培到阳畦, 次年 3 月份定植, 初花期取不同发育时期的花蕾卡诺固定液固定, 用于减数分裂

染色体制片。

1.2 染色体制备

根尖染色体制片：将固定后的根尖在蒸馏水中浸洗 2~3 次，切取根尖生长点放入 2% 的纤维素酶（“Onozuka” R-10，日本）和 2% 的果胶酶（pectinase, Serva）混合液中，在 25 °C 下酶解 1.5~2.0 h，蒸馏水中后低渗 30 min，在载玻片上涂片，然后火焰干燥，选染色体分散、形态良好的制片用于 FISH。

减数分裂染色体制片：将固定的异源三倍体幼蕾在蒸馏水中浸洗 2~3 次，取 1 个花药采用苏木精染色压片用 Olympus 光学显微镜观察，确定所处的时期，其余 5 个花药放入 1.5 mL 离心管中，加入 2% 的纤维素酶和 2% 的果胶酶混合液 100 μ L，在 25 °C 下酶解 2~2.5 h 吸去酶液，用蒸馏水洗 2~3 次，换为新鲜的卡诺固定液，然后用小吸管轻轻吹打，使花药破碎细胞完全散开，吸取少量细胞悬浮液滴片，火焰干燥后 -20 °C 保存备用。

1.3 原位杂交及信号检测

采用碱裂解法提取 25S rDNA 亚克隆 DNA，采用 DIG-Nick Translation kit 试剂盒（Roche，德国）进行标记。制备好的染色体标本，在 60 °C 烘箱内烤片 1 h，70 °C 下用 2 \times SSC 配制的 70% 去离子甲酰胺变性 2.5 min，立即在 -20 °C 下预冷的 70%、95%、100% 酒精系列浸洗脱水各 5 min，自然干燥。在染色体变性的同时配制杂交液，75 °C 下变性 5 min，迅速置于冰上至少 5 min。

加杂交液于染色体玻片上，盖上盖玻片置于保湿盒中在 37 °C 杂交 16~21 h。

杂交后用 2 \times SSC 在 37 °C 浸洗 3 次，每次 5 min，用羊抗地高辛荧光素抗体和兔抗羊 FITC 偶联物检测杂交信号，反应结束后用 1 \times PBS 在室温下浸洗 3 次，每次 5 min，避光自然干燥。

染色体制片用 2 μ g \cdot mL⁻¹ DAPI 复染。在 Zeiss 荧光显微镜（Axioskop 40）下观察荧光原位杂交信号，用 CCD 照相装置捕获图像，用 Axiovision Imaging System 和 Photoshop 软件对图像进行合成和处理。

1.4 花粉量、花粉生活力测定和杂交结实率调查

花粉量采用血球计数板计数法计数。花粉生活力测定采用 TTC 染色法（张子学和孙峰，2002）。

采用蕾期人工去雄授粉的方法进行二倍体甘蓝与异源三倍体杂种的正交和反交，统计其结荚率和结籽率。结荚率（%）= 坐荚数/授粉花蕾数 \times 100；结籽率（%）= 每种荚平均种子数/每种荚平均胚珠数 \times 100。

2 结果与分析

2.1 25S rDNA 在大白菜—结球甘蓝异源三倍体根尖中期染色体上的 FISH 分析

25S rDNA 在大白菜—结球甘蓝异源三倍体及其二倍体亲本根尖中期染色体上的 FISH 定位表明，大白菜—结球甘蓝异源三倍体染色体数为 2n = 28 条，其中 9 条染色体上检出了 25S rDNA-FISH 信号（图 1，A，绿色）。

对照先发表的大白菜和结球甘蓝基于 25S rDNA-FISH 的核型（Lim et al., 2005；王太霞 等，2006；轩淑欣 等，2007）进行分析，建立异源三倍体基于 25S rDNA-FISH 信号的核型，表明该异源三倍体含有 2 套结球甘蓝来源的染色体和 1 套大白菜来源的染色体，其中 4 个信号位于结球甘蓝的 4 号和 7 号染色体；另 5 个信号位于大白菜的 1~5 号染色体（图 1，B）。

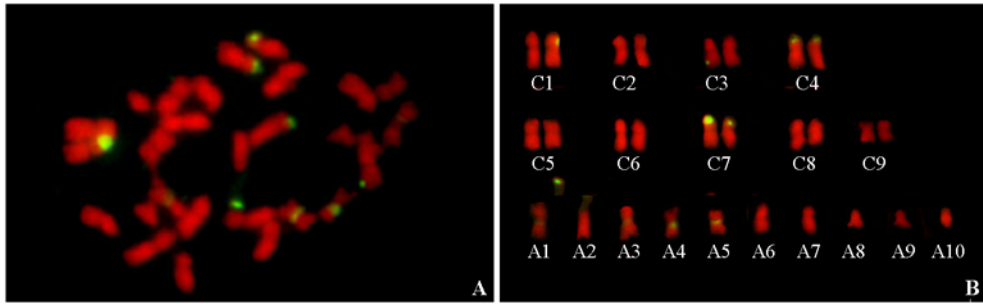


图 1 25S rDNA 探针在大白菜—结球甘蓝异源三倍体有丝分裂中期染色体上的杂交及核型

A: 25S rDNA 在异源三倍体（ACC）中期染色体上的分布；B: 异源三倍体（ACC）基于 25S rDNA-FISH 信号核型图。
C1~C9 为结球甘蓝染色体编号；A1~A10 为大白菜染色体编号。

Fig. 1 25S rDNA FISH mapping on metaphase chromosomes of Chinese cabbage - head cabbage allotriploid (ACC) and karyotype

A: Distribution of 25S rDNA on Chinese cabbage - head cabbage allotriploid; B: Karyotype image of Chinese cabbage - head cabbage allotriploid based on 25S rDNA-FISH. C1 - C9 was number of head cabbage chromosomes, respectively;
A1 - A10 was number of Chinese cabbage chromosomes, respectively.

2.2 大白菜—结球甘蓝异源三倍体减数分裂染色体行为的 25S rDNA-FISH 分析

细线期至粗线期，结球甘蓝和大白菜来源的染色体相互缠绕在一起，形成几个大小不一的染色体团，2~3 个 25S rDNA-FISH 信号聚集分布在这些染色体团上（图 2，A）。双线期，染色体逐渐缩短分散（图 2，B）。终变期，染色体的构型表现出多样性，有单价体、二价体和三价体（图 2，C~E），其中以含有 3 个三价体和 4 个二价体的细胞所占比例最多。25S rDNA-FISH 结果分析表明，大白菜 5 个含有 25S rDNA 位点的染色体中，其中两个与结球甘蓝染色体的同源程度较低，常以单价体的形式存在（图 2，D、E）；1 个与结球甘蓝 1 对同源染色体具有非常高的同源性，常以三价体的形式存在（图 2，E）；还有 2 个具有杂交信号的染色体往往和结球甘蓝的 1~3 个二价体重叠或紧挨在一起形成拟多价体（Cockerham & Galletta, 1976; 庄东红和石田雅士, 2000）（图 2，D），说明这些染色体间存在一定程度的同源性。平均每个细胞中的单价体、二价体、三价体和拟多价体分别约为 4.47、4.37、2.70 和 1.00 个（表 1）。

表 1 大白菜—结球甘蓝异源三倍体终变期
染色体联会构型及个数

Table 1 Chromosome configuration number of Chinese Cabbage - head cabbage allotriploid at diakinesis

染色体构型 Chromosome configuration	数量 Number	平均数 Average
单价体 Univalent	192	4.47
二价体 Bivalent	188	4.37
三价体 Trivalent	116	2.70
拟多价体 Pseudo-multivalent	43	1.00

注：观察总细胞数 43 个。
Note: The total number of observed cell at diakinesis stage is 43.

中期 I，大多数细胞中多价体解离为二价体和单价体，二价体排列在赤道板上，单价体游离于赤道板周围（图 2，F），数量 1~7 条不等，以 4~6 条居多，约占细胞总数的 69.4%（表 2），也有少数细胞中存在二价体游离于赤道板周围的现象（图 2，G）。

后期 I，二价体正常分离移向细胞两极，单价体或随机到达一极或成为落后染色体（图 2，H、I），此外还见有两条染色单体提前分开等现象（图 2，H）。后期 I 两极染色体数多样，有两极染色体数之和为 28 条的（如 13/15、12/16、14/14、11/17），也有两极染色体数之和不等于 28 条的（如 13/14、10/17、16/13）（图 2，J~L），其中以 13/15 方式分离的所占比率最高，约为 30.77%（表 3）。大多数细胞中能够检出 9 个杂交信号，分离方式有 4/5、6/3 等。

中期 II，两组染色体分别排列在各自的赤道板上，多数细胞中含有游离于赤道板外的染色体（图 2，M）；后期 II，每极的染色体数有 10~19 不等（图 2，N、O），同时也有落后染色体的存在，致使四分体时期 7.5% 的细胞中出现了微核（图 2，P）。

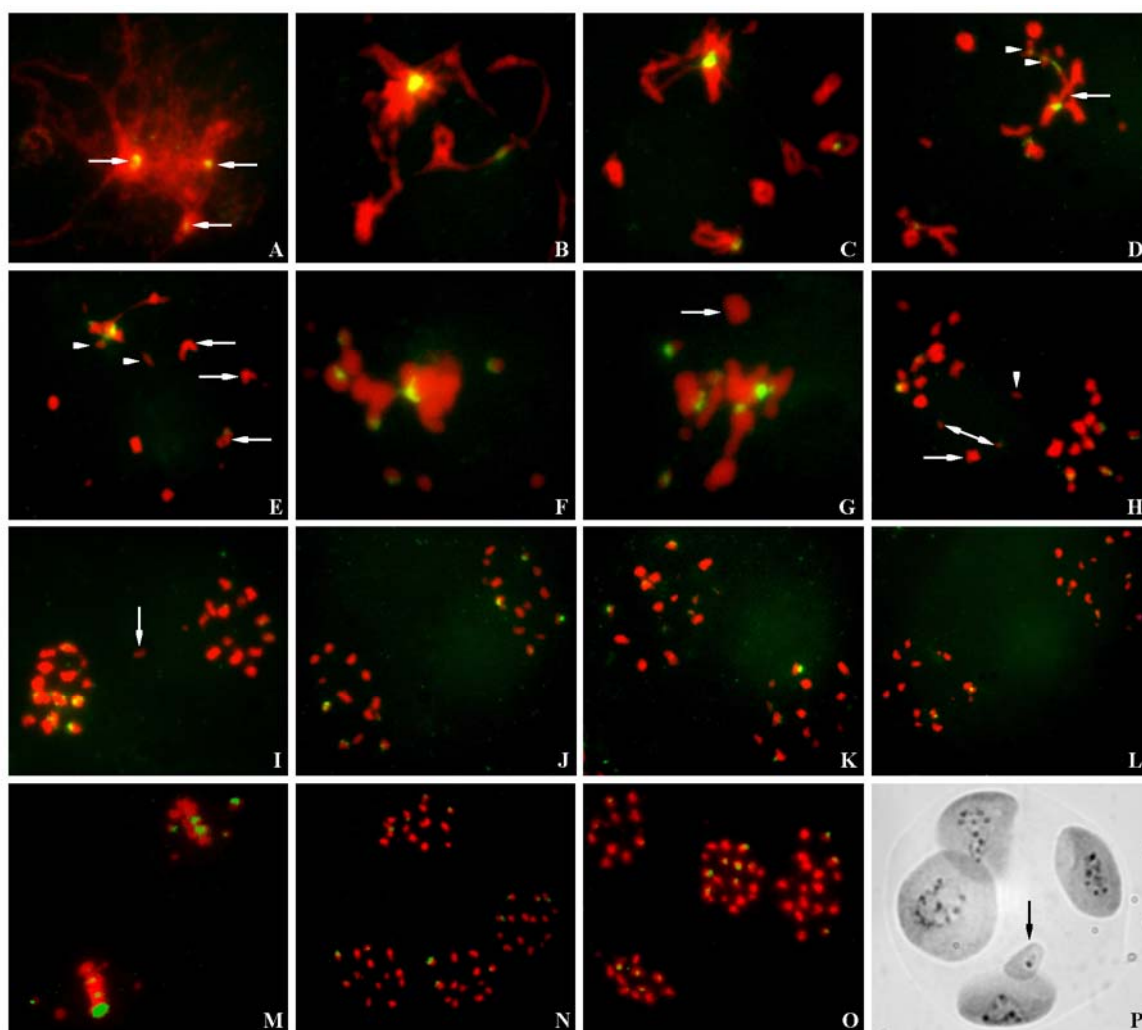


图 2 大白菜—结球甘蓝异源三倍体 (ACC) 基于 25S rDNA 的 FISH 分析

- A: 粗线期, 箭头示 25S rDNA 信号; B: 双线期; C: 终变期早期; D: 终变期, 有柄箭头示拟多价体, 无柄箭头示有信号单价体;
 E: 终变期, 有柄箭头示三价体, 无柄箭头示有信号染色体; F: 中期 I, 示游离染色体; G: 中期 I, 箭头示游离二价体;
 H: 后期 I, 无柄箭头示落后单价体, 有柄箭头示落后二价体染色体, 双箭头示染色单体提前分离;
 I: 后期 I, 箭头示落后染色体; J: 后期 I, 示 13/15 分离; K: 后期 I, 示 13/16 分离;
 L: 后期 I, 示 15/15 分离; M: 中期 II; N: 后期 II, 示 13/13/14/15 分离;
 O: 后期 II, 示 10/12/17/17 分离;
 P: 末期 II, 箭头示微核。

Fig. 2 FISH analysis based on 25S rDNA probe of Chinese cabbage head cabbage allotriploid (ACC)

- A: Pachytene, the arrow showing 25S rDNA signals; B: Diplotene; C: Earlier diakinesis; D: Diakinesis, the arrow with handle showing pseudo multivalents, the arrows without handle showing univalents with signals; E: Diakinesis, the arrow with handle showing trivalent, the arrows without handle showing univalents with signals; F: Metaphase I, showing containing dissociated univalents; G: Metaphase I, the arrow showing dissociated bivalent; H: Anaphase I, the arrow without handle showing lagged univalent, the arrow with handle showing lagged bivalent, the double arrow showing separated chromatids; I: Anaphase I, the arrow showing lagged univalent;
 J: Anaphase I, showing 13/15 separation; K: Anaphase I, showing 13/16 separation;
 L: Anaphase I, showing 15/15 separation; M: Metaphase II; N: Anaphase II, showing 13/13/14/15 separation; O: Anaphase II, showing 10/12/17/17 separations;
 P: Telophase II, the arrow showing micronucleus.

表 2 大白菜—结球甘蓝异源三倍体中期 I 游离
单价体数及细胞比率

Table 2 Dissociated univalent number and cell percentage of
Chinese cabbage - head cabbage allotriploid at metaphase I

游离单价体数 No. of dissociated univalents	细胞数 No. of cells	所占比率/% Percentage
1	4	6.78
2	5	8.48
3	5	8.48
4	13	22.03
5	19	32.20
6	9	15.25
7	4	6.78

注：观察总细胞数 59 个。

Note: The total number of observed cell at metaphase I stage is 59.

表 3 大白菜—结球甘蓝异源三倍体后期 I 的染色体
分离方式及细胞比率

Table 3 Chromosome distribution way and cell percentage of
Chinese cabbage - head cabbage allotriploid at anaphase I

染色体分离方式 Chromosome distribution way	细胞数 No. of cells	所占比率/% Percentage
9/19	2	1.40
10/18	2	1.40
11/17	13	9.09
12/16	25	17.48
13/15	44	30.77
14/14	14	9.79
其它 Others	43	30.07

注：观察总细胞数 143 个。

Note: The total number of observed cell at anaphase I stage is 143.

2.3 大白菜—结球甘蓝异源三倍体的花粉特性

大白菜—结球甘蓝异源三倍体能正常开花散粉，每个花药内平均有 1.07×10^5 个花粉粒，与大白菜没有显著差异，但大多为空瘪或畸形的，整齐度为 42.6%，花粉生活力仅为 15.9%，极显著低于其二倍体亲本（表 4）。说明异源三倍体的花粉母细胞大多能完成减数分裂和配子形成过程，其花粉生活力的丧失可能主要是染色体数和组成不均衡所致。

表 4 大白菜—结球甘蓝异源三倍体的花粉特性

Table 4 Characters of pollen grains in Chinese cabbage - head cabbage allotriploid

株系 Plants	花粉量/（个·花蕾 ⁻¹ ） Amount of pollen (No. · bud ⁻¹)	花粉整齐度/% Pollen regularity	花粉生活力/% Pollen viability
异源三倍体 Allotriploid	1.07×10^5 bB	42.6 cC	15.9 cC
2x 结球甘蓝 2x head cabbage	1.40×10^4 aA	89.2 bB	75.0 bB
2x 大白菜 2x Chinese cabbage	1.14×10^5 bB	91.4 aA	88.4 aA

2.4 大白菜—结球甘蓝异源三倍体的结实性

大白菜—结球甘蓝异源三倍体自交或与二倍体结球甘蓝回交，授粉后大多子房都能够膨大生长，具有很高的结荚率，但结籽率极低，花期自交或回交均未得到种子，蕾期自交或回交的结籽率仅为 0.01% 左右（表 5），这对该异源三倍体的进一步应用造成了一定困难。

表 5 大白菜—结球甘蓝异源三倍体结荚率与结籽率

Table 5 The rate of pod and seed settings for Chinese cabbage - head cabbage allotriploid

授粉时期及类型 Pollination period and type	授粉花数 No. of pollinated flowers	坐荚数 No. of pods	子粒数 No. of seeds	结荚率/% Pod setting rate	结籽率/% Seed setting rate
蕾期回交 Backcross at bud stage	3 986	3 915	14	98	0.01
蕾期自交 Selfing at bud stage	3 582	3 524	17	98	0.01
花期回交 Backcross at flower stage	983	917	0	95	0
花期自交 Selfing at flower stage	536	442	0	82	0

3 讨论

异源三倍体是进行异附加系或异代换系创建的关键材料。大白菜—结球甘蓝异源三倍体（ACC）的合成，从理论上讲不仅为芸薹属提供了新种质，而且为在 1 个细胞内研究 A、C 基因组不同染色体间的同源性及互作和表达关系提供了基础材料。大量研究表明，芸薹属 A、C 基因组染色体间具

有较高的同源性 (Attia & Robbelen, 1986; Schmidt et al., 2001; Kaneko et al., 2002; 李宗芸 等, 2002; 鄯丽娟 等, 2007)。本研究中通过观察大白菜—结球甘蓝异源三倍体杂种在减数分裂期间染色体的行为, 可以看出这两个物种间的亲缘关系较近: 前期 I 早期, 结球甘蓝来源的两套 C 染色体组和大白菜来源的 1 套 A 染色体组相互缠绕在一起并没有出现分组现象; 终变期, A 组染色体并不完全以单价体形式存在, 而是部分与 C 组染色体形成三价体或拟多价体。顾爱侠等 (2006) 在大白菜—结球甘蓝异源三倍体 (AAC) 中观察到 1~5 个三价体, 以形成 3~4 个为主。刘炜等 (2008) 在对两个单体异附加系中也发现其中一个附加系在终变期形成较高频率的异源三价体, 而另一个附加染色体则多以单价体的形式存在。这说明 A、C 两个基因组不同染色体间的同源程度不同。本研究中观察统计结果表明, 终变期大多数细胞中可观察到 3 个三价体和 4 个单价体, 这表明 A 基因组有 3 条染色体与 C 基因组染色体具有较高的同源性, 有 4 条染色体与 C 基因组染色体的同源程度较低。“拟多价体”是几个二价体“次级配对”形成的聚合体, 是在多倍体植物减数第 1 次分裂中期时出现的现象, 在柿树减数分裂和 *Vaccinium* 的多倍体种中有过报道 (Cockerham & Galletta, 1976; 庄东红和石田雅士, 2000)。此外, 芸薹属基因组内部各个染色体间也存在很高的同源性, 也有报道可以发生“自体配对” (Armstrong & Keller, 1981, 1982; Choudhary & Joshi, 2001)。本研究所观察到的大白菜来源的两条染色体与结球甘蓝来源的 1~3 个二价体聚合形成的“拟多价体”, 揭示了这些染色体间存在着一定程度的同源性, 可能发生了“自体配对”及“次级配对”。

近年来利用基因组原位杂交 (Genome *in situ* hybridization, GISH) 技术进行杂种鉴定的报道很多 (Wei et al., 2006; Ge & Li, 2007; 乔海云 等, 2009)。然而, 利用 GISH 技术进行杂种鉴定, 亲本的基因组必须分化到一定的程度才能将杂种中不同亲本的基因组区分开来。由于芸薹属 A、C 基因组的同源程度很高, 大白菜和结球甘蓝染色体较小且形态相近, GISH 技术在芸薹属 A、C 基因组杂种鉴定中存在一定难度 (李宗芸 等, 2002; 鄯丽娟 等, 2007)。而利用 rDNA 进行染色体 FISH, 由于大白菜和结球甘蓝 rDNA 位点不同, 因此可以在杂种中反映出来。本研究中, 利用 25S rDNA-FISH 对大白菜—结球甘蓝异源三倍体染色体组成进行了区分, 揭示了 A、C 基因组不同染色体间存在不同程度的同源性。然而, 受 rDNA 位点仅存在于部分染色体及减数分裂期染色体形态难以区分所限, 不能明确揭示具体染色体间的同源关系。

由于大白菜—结球甘蓝异源三倍体中包含了来自两个亲本的 3 个不同染色体组, 在减数分裂中染色体不能正常配对分离, 导致四分体时期各分体基本遗传物质的不平衡或丢失, 致使形成的正常的有生活力的花粉粒所占比例极低。由此可以推测其大孢子母细胞的减数分裂行为也必然存在着复杂的异常现象, 其结果必定产生大量的无生活力的大孢子, 从而表现在其自交或与结球甘蓝回交中存在着严重的不稔现象, 使得结籽率极低, 为进一步利用其创建异附加系带来很大困难。

References

- Akaba M., Kaneko Y., Hatakeyama K., Ishida M., Bang S W., Matsuzawa Y. 2009. Identification and evaluation of clubroot resistance of radish chromosome using a *Brassica napus* - *Raphanus sativus* monosomic addition line. *Breeding Science*, 59: 203 - 206.
- Armstrong K C., Keller W A. 1981. Chromosome pairing in haploids of *Brassica campestris*. *Theor Appl Genet*, 59: 49 - 52.
- Armstrong K C., Keller W A. 1982. Chromosome pairing in haploids of *Brassica oleracea*. *Can J Genet Cytol*, 24: 735 - 739.
- Attia T., Robbelen G. 1986. Meiotic pairing in haploid and amphidiploids of spontaneous versus synthetic origin in rape *Brassica napus* L. *Can J Genet Cytol*, 28: 330 - 334.
- Chen Xue-ping, Shen Er-qiao, Zhang Cheng-he, Li Xiao-feng, Xuan Shu-xin, Shen Shu-xing. 2010. Transmission of $n+1$ gametes and obtaining of two bisomic addition lines of flowering Chinese cabbage - Chinese kale. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (23): 4871 - 4876. (in Chinese)
- 陈雪平, 申二巧, 张成合, 李晓峰, 轩淑欣, 申书兴. 2010. 菜薹—芥蓝单体异附加系 $n+1$ 配子传递及两个二体异附加系的获得. *中国农业科学*, 43 (23): 4871 - 4876.
- Choudhary B R., Joshi P. 2001. Crossability of *Brassica tournefortii* and *B. rapa*, and morphology and cytology of their F_1 hybrids. *Theor Appl*

- Genet, 102: 1123 – 1128.
- Cockerham L E, Galletta G J. 1976. A survey of pollen characteristics in certain *Vaccinium* species. J Amer Soc Hort Sci, 101 (6): 671 – 675.
- Dong Hui, Xuan Shu-xin, Zhao Jian-jun, Wang Yan-hua, Gu Ai-xia, Shen Shu-xing. 2013. Research progress of alien addition lines in *Brassica* crops. Acta Horticulturae Sinica, 40 (9): 1719 – 1730. (in Chinese)
- 董 辉, 轩淑欣, 赵建军, 王彦华, 顾爱侠, 申书兴. 2013. 芸薹属作物异附加系的研究进展. 园艺学报, 40 (9): 1719 – 1730.
- Fukui K, Nakayama S, Ohmido N, Yoshiaki H, Yamabe M. 1998. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes. Theoretical and Applied Genetics, 96: 325 – 330.
- Ge X H, Li Z Y. 2007. Intra- and intergenomic homology of B-genome chromosomes in trigeneric combinations of the cultivated *Brassica* species revealed by GISH analysis. Chromosome Research, 15: 849 – 861.
- Geleta M, Heneen W K, Stoute A I, Muttucumaru N, Scott R J, King G J, Kurup S, Bryngelsson T. 2012. Assigning *Brassica* microsatellite markers to the nine C-genome chromosomes using *Brassica rapa* var. *trilocularis* – *B. oleracea* var. *alboglabra* monosomic alien addition lines. Theor Appl Genet, 125: 455 – 466.
- Gu Ai-xia, Shen Shu-xing, Chen Xue-ping, Zhang Chen-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. 大白菜与结球甘蓝异源三倍体的获得及细胞学观察. 园艺学报, 33 (1): 73 – 77.
- Gu Ai-xia, Zhao Yu-jing, Qie Li-juan, Xuan Shu-xin, Wang Yan-hua, Shen Shu-xing. 2008. Production and SSR identification and GISH analysis of interspecific hybrids between diploid Chinese cabbage and tetraploid cabbage. Journal of Plant Genetic Resources, (9): 144 – 150. (in Chinese)
- 顾爱侠, 赵玉靖, 鄢丽娟, 轩淑欣, 王彦华, 申书兴. 2008. 二倍体大白菜与四倍体结球甘蓝杂种的获得及其 SSR 鉴定与 GISH 分析. 植物遗传资源学报, (9): 144 – 150.
- Gu Ai-xia, Zheng Bao-zhi, Wang Yan-hua, Xuan Shu-xin, Luo Shuang-xia, Shen Shu-xing. 2009. Obtaining and studies of Chinese cabbage monosomic alien addition line with chromosome 3 of cabbage. Acta Horticulturae Sinica, 36 (1): 39 – 44. (in Chinese)
- 顾爱侠, 郑宝智, 王彦华, 轩淑欣, 罗双霞, 申书兴. 2009. 附加甘蓝 3 号染色体的大白菜单体异附加系的获得与研究. 园艺学报, 36 (1): 39 – 44.
- Hasterok R, Jenkins G, Langdon T, Maluszynska J. 2001. Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. Theor Appl Genet, 103: 486 – 490.
- Hasterok R, Wolny E, Kulak S, Zdziechiewicz A, Maluszynska J, Heneen W K. 2005. Molecular cytogenetic analysis of *Brassica rapa* – *Brassica oleracea* var. *alboglabra* monosomic addition lines. Theor Appl Genet, 111: 196 – 205.
- Heneen W K, Geleta M, Brismar K, Xiong Z Y, Pires C, Hasterok R, Stoute A I, Scott R J, King G J, Kurup S. 2012. Seed colour loci, homoeology and linkage groups of the C genome chromosomes revealed in *Brassica rapa* – *B. oleracea* monosomic alien addition lines. Annals of Botany, 109: 1227 – 1242.
- Kaneko Y, Nagasawa N, Bang W, Matsuzawa Y. 2002. Homoeological relationship between the f chromosome of *Brassica rapa* and the e chromosome of *Brassica oleracea*. Plant Breeding, 121: 171 – 173.
- Kulak S, Hasterok R, Maluszynska J. 2002. Karyotyping of *Brassica* amphidiploids using 5S and 25S rDNA as chromosome markers. Hereditas, 136: 144 – 150.
- Kwon J K, Kim B D. 2009. Localization of 5S and 25S rRNA genes on somatic and meiotic chromosomes in *Capsicum* species of chili pepper. Molecules and Cells, 27 (2): 205 – 209.
- Li X F, Xuan S X, Wang J L, Zhang S L, Wang Y H, Zhang C H, Shen S X, Shen E Q. 2013. Generation and identification of *Brassica alboglabra* – *B. campestris* monosomic alien addition lines. Genome, 56 (3): 171 – 177.
- Li Zong-yun, Li Mao-teng, Huang Rong-gui, Wu Xiao-ming, Song Yun-chun. 2002. Genomic *in situ* hybridization (GISH) discriminates the A, B and C genomes in *Brassica* allotetraploid species. Chin J Oil Crop Sci, 24 (1): 10 – 14. (in Chinese)
- 李宗芸, 栗茂滕, 黄荣桂, 伍晓明, 宋运淳. 2002. 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. 中国油料作物学报, 24 (1): 10 – 14.
- Lim K B, de Jong H, Yang T J, Park J Y, Kwon S J, Kim J S, Lim M H, Kim J A, Jin M, Jin Y M, Kim S H, Lim Y P, Bang J W, Kim H I, Park B S. 2005. Characterization of rDNAs and tandem repeats in the heterochromatin of *Brassica rapa*. Mol Cells, 19 (3): 436 – 444.
- Liu Wei, Shen Shu-xing, Wang Yan-hua, Zhang Cheng-he, Xuan Shu-xin, Chen Xue-ping, Li Xiao-feng, Luo Shuang-xia. 2008. A study on obtainment and identification of Chinese cabbage-cabbage addition lines. Acta Horticulturae Sinica, 35 (2): 207 – 212. (in Chinese)
- 刘 炜, 申书兴, 王彦华, 张成合, 轩淑欣, 陈雪平, 李晓峰, 罗双霞. 2008. 大白菜—甘蓝异附加系的获得与鉴定. 园艺学报, 35 (2): 207 – 212.

- Lü Wen-xin, Wang Yan-hua, Zhao Jian-jun, Gu Ai-xia, Li Yan-xia, Guan Zhi-kun, Wen Xiao-ying, Shen Shu-xing. 2011. Generation and identification of Chinese cabbage - cabbage disomic alien addition line 1. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (7): 1275 - 1282. (in Chinese)
- 吕文欣, 王彦华, 赵建军, 顾爱侠, 李艳霞, 管志坤, 闻晓英, 申书兴. 2011. 大白菜-结球甘蓝 1 号染色体二体异附加系的获得与鉴定. *园艺学报*, 38 (7): 1275 - 1282.
- Okagaki R J, Kynast R G, Livingston S M, Russell C D, Rines H W, Phillips R L. 2001. Mapping maize sequences to chromosomes using oat-maize chromosome addition materials. *Plant Physiol*, 125: 1228 - 1235.
- Qiao Hai-yun, Li Fei, Zhang Shu-jiang, Zhang Shi-fan, Sun Ri-fei. 2009. Intergeneric hybridization of *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) olsson and *Orychophragmus violaceus* and GISH identification. *Acta Horticulture Sinica*, 36 (10): 1473 - 1478. (in Chinese)
- 乔海云, 李 菲, 张淑江, 章时蕃, 孙日飞. 2009. 大白菜与诸葛菜属间杂种及 GISH 鉴定. *园艺学报*, 36 (10): 1473 - 1478.
- Qie Li-juan, Shen Shu-xing, Xuan Shu-xin, Wang Yan-hua, Chen Xue-ping, Zhang Cheng-he, Li Xiao-feng, Luo Shuang-xia. 2007. Karyotype analysis of Chinese cabbage and cabbage by genome *in situ* hybridization. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1459 - 1464. (in Chinese)
- 郗丽娟, 申书兴, 轩淑欣, 王彦华, 陈雪平, 张成合, 李晓峰, 罗双霞. 2007. 大白菜和结球甘蓝基因组原位杂交及核型分析. *园艺学报*, 34 (6): 1459 - 1464.
- Ren Yan-rui, Qiao Xue-hua, Zhang Cheng-he, Li Xiao-feng, Sheng Shu-xing. 2009. Synthesis of allotriploid (CCA) through hybridization between allotetraploid (AACC) and diploid (CC) in *Brassica* vegetables and cytological studies. *Journal of Plant Genetic Resources*, 10 (2): 230 - 235. (in Chinese)
- 任艳蕊, 乔雪华, 张成合, 李晓峰, 申书兴. 2009. 芥蓝-菜心种间三倍体 CCA 的合成及细胞学研究. *植物遗传资源学报*, 10 (2): 230 - 235.
- Ren Yan-rin, Zhang Cheng-he, Shen Er-qiao, Xuan Shu-xin, Shen Shu-xing. 2010. Chromosome number identification and generation of monosomic alien addition line in the triploid interspecies hybrid of flowering Chinese cabbage - Chinese kale. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (2): 213 - 220. (in Chinese)
- 任艳蕊, 张成合, 申二巧, 轩淑欣, 申书兴. 2010. 芥蓝-菜薹种间三倍体回交子代染色体数鉴定及单体异附加系的选育. *园艺学报*, 37 (2): 213 - 220.
- Schmidt R, Acarkan A, Boivin K. 2001. Comparative structural genomics in the *Brassica* family. *Plant Physiology Biochemistry*, 39: 253 - 262.
- Wang Tai-xia, Wu Chun-hong, Huang Jin-yong, Wei Wen-hui. 2006. Karyotyping of *Brassica oleracea* L. based on rDNA and *C₀t-1* DNA fluorescence *in situ* hybridization. *J Wuhan Univ: Nat Sci Ed*, 52 (20): 230 - 240. (in Chinese)
- 王太霞, 吴春红, 黄进勇, 魏文辉. 2006. 甘蓝 rDNA 及 *C₀t-1* DNA 荧光原位杂交及其核型分析. *武汉大学学报: 理学版*, 52 (20): 230 - 240.
- Wang X E, Zhang C H, Xuan S X, Man H, Liu H H, Shen S X. 2008. Monosomic addition lines of flowering Chinese cabbage (*B. campestris* L. ssp. *chinensis* var. *parachinensis* L. H. Bailey) - Chinese kale (*B. oleracea* L. var. *alboglabra* L. H. Bailey). *Agricultural Sciences in China*, 7 (6): 656 - 663.
- Wei W H, Zhang S F, Li J, Wang L J, Chen B, Fang X P, Wang Z, Luo L X. 2006. Analysis of F_1 hybrid and BC_1 monosomic alien addition line plants from *Brassica oleracea* × *Sinapis alba* by GISH. *Chinese Science Bulletin*, 51 (23): 2872 - 2877.
- Xu Yan-hao, Yang Fei, Cheng You-lin, Ma Lu, Wang Jian-bo, Li Li-jia. 2007. Comparative analysis of rDNA distribution in metaphase chromosomes of Cucurbitaceae species. *Hereditas*, 29 (5): 614 - 620. (in Chinese)
- 徐延浩, 杨 飞, 程有林, 马 璐, 王建波, 李立家. 2007. 45S rDNA 和 5S rDNA 在南瓜、丝瓜和冬瓜染色体上的比较定位. *遗传*, 29 (5): 614 - 620.
- Xuan Shu-xin, Feng Da-ling, Li Yan-bin, Zhao Yu-jing, Zhang Cheng-he, Shen Shu-xing. 2013. Recent advances in *Brassica* genome research by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (9): 1710 - 1718. (in Chinese)
- 轩淑欣, 冯大领, 李岩宾, 赵玉靖, 张成合, 申书兴. 2013. FISH 技术在芸薹属作物基因组研究中的应用进展. *园艺学报*, 40 (9): 1710 - 1718.
- Xuan Shu-xin, Shen Shu-xing, Zhao Jian-jun, Zhang Cheng-he, Chen Xue-ping, Qie Li-juan. 2007. Location of 25S rDNA and 5S rDNA in Chinese cabbage-pe-tsai metaphase chromosome. *Scientia Agricultura Sinica*, 40 (4): 782 - 787. (in Chinese)
- 轩淑欣, 申书兴, 赵建军, 张成合, 陈雪平, 郗丽娟. 2007. 25S rDNA 和 5S rDNA 在大白菜中期染色体上的 FISH 定位. *中国农业科学*, 40 (4): 782 - 787.
- Zhang Zi-xue, Sun Feng. 2002. The selection of the best testing method on the pollen viability in hot pepper. *Seed*, (1): 32 - 33. (in Chinese)
- 张子学, 孙 峰. 2002. 辣椒花粉生活力最佳测定方法的筛选. *种子*, (1): 32 - 33.
- Zhuang Dong-hong, Masashi Ishida. 2000. Investigation on meiosis and microspore genesis in *Diospyros kaki* L. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 18 (5): 356 - 358. (in Chinese)
- 庄东红, 石田雅士. 2000. 柿树减数分裂和小孢子形成过程的观察. *武汉植物学研究*, 18 (5): 356 - 358.