

Moricandia arvensis 与甘蓝型油菜属间 杂种的获得及其生物学特性研究*

孟金陵** 严准 甘莉

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉, 430070)

提 要 以 C_3 作物甘蓝型油菜作父本与野生 C_3-C_4 中间型植物 *Moricandia arvensis* 作有性杂交, 经子房培养和胚性芽挽救, 获得了 4 个属间杂种, 经腋芽繁殖使杂种群体增至数百株。RFLP 分析结果显示, 杂种核 DNA 具有两个亲本的特征指纹, 而其细胞质中仅含母本 *Moricandia arvensis* 的线粒体 DNA 指纹。杂种多具 33 条染色体, 为双亲配子染色体数之和。虽然杂种植株在大多数形态特征上表现为双亲的中间类型, 但在某些性状上明显趋向某一亲本。杂种植株的一般特征是半匍匐性, 浅裂叶, 开浅黄花。其 CO_2 补偿点很高, 为 C_3 类型。花粉母细胞减数分裂不正常, 有多价体产生。杂种雌雄性皆不育。用秋水仙素将杂种加倍为双二倍体后, 仍然雄性不育。对进一步向芸薹属作物基因组中导入 C_3-C_4 基因的技术途径进行了讨论。

关键词 甘蓝型油菜; *Moricandia arvensis*; C_3-C_4 ; 胚性芽; 属间杂种; 生物学特性

在十字花科中 *Moricandia* 是唯一具 C_3-C_4 中间型物种的属。其中研究较多的是 *Moricandia arvensis*, 其 CO_2 补偿点(τ)约 $15 \mu lCO_2L^{-1}$, 介于 C_4 植物($\tau=0\sim 5 \mu lCO_2L^{-1}$)和 C_3 植物($\tau=40\sim 60 \mu lCO_2L^{-1}$)之间^[4, 7]。*M. arvensis* 还具有与 CO_2 补偿点低相关的抗干旱等优良生物学特性^[6, 11]。*Moricandia* 属与芸薹属作物同属芸薹族(Brassicaceae), 亲缘关系较近^[2, 17]。从 80 年代以来, 英国、日本、印度等国的科学工作者相继开展了 *M. arvensis* 与芸薹属间的远缘杂交, 以图把 C_3-C_4 光合特性转移到芸薹属栽培种中。Apel 等(1984), Takahata 及其同事(1990, 1993)通过子房培养和胚挽救, 在 *M. arvensis* 与甘蓝、白菜、黑芥及甘蓝型油菜间获得了有性杂种, 杂种高度不育^[4, 13, 14, 15]。一直未能见到他们对杂种后代育性及性状特征的进一步描述。Toriyama 等(1987), Kirti 等(1992)和 O'Neill 等(1996)采用原生质体融合技术分别获得了 *M. arvensis* 与甘蓝、白菜、芥菜及甘蓝型油菜间的体细胞杂种, 仅后者报道了杂种的光合特性偏油菜亲本^[9, 10, 16]。至今未见有关 *M. arvensis* C_3-C_4 特性转移到芸薹属栽培种遗传背景的成功报道。有必要继续开展 *Moricandia* 与油菜的属间杂交工作, 以最终达到改良芸薹属栽培作物光合性能的目的。

* 国家自然科学基金资助

致谢: 部分研究工作在英国 John Innes Centre 完成, 得到了该中心芸薹和油料作物研究系的 Dr D. Lydiate, Dr S. Rawsthorne, Mr. A. Sharpe 和 Mr. C. Morgan 的协助, 谨表谢意。

** 通讯联系人。

收稿日期: 1997-09-26, 收到修改稿日期: 1997-11-19

1 材料和方法

母本 *M. arvensis* 由英国 John Innes Centre 的 Rawsthorne 博士惠赠, 父本为甘蓝型油菜品种 Express 和 Libravo 双单倍体品系, 均引自英国 John Innes Centre。1995 年春季将种植于温室的 *M. arvensis* 人工去雄, 授上父本花粉后套袋。授粉 10 天后取下角果明显伸长的绿色杂交子房, 经表面消毒后, 接种于蔗糖浓度和激素成分不同的 MS 培养基中。本实验用的各种培养基成分见表 1。在 MS 培养基中对杂种苗作染色体加倍。从培养基中切取长约 2 cm 带有两片叶的幼芽, 转至秋水仙素浓度为 0.01% 的 MS 培养基中培养 3 天, 然后转入无秋水仙素的 MS 培养基中, 待生根后再移栽。

杂种的酯酶同工酶分析, DNA 提取和 RFLP 指纹分析程序同文献 2, 3。用于核 DNA 分析的油菜基因组探针由 John Innes Centre 的 D. Lydiate 博士提供, 供线粒体 DNA 分析的甜菜探针由该中心的薛勇彪博士提供。

观察杂种体细胞的染色体数目时, 以幼小的子房为材料。将所取的子房先放入 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉水溶液中处理 4~

5 小时, 然后用卡诺固定液固定。在 1N 盐酸中解离 8 分钟后, 用卡宝品红染色观察。

2 实验结果

2.1 属间杂种的获得和鉴定

以 *M. arvensis* 作母本与甘蓝型油菜品种 Express 和 Libravo 杂交授粉近千朵花, 大多数子房在授粉一周后发黄萎蔫。摘取保持绿色并明显伸长长大的子房, 培养于蔗糖浓度为 2%~4% 的 MS 培养基中。多数子房在培养数天后生长停滞, 2 周后子房呈水渍状, 未能解剖出膨大的胚珠和肉眼可见的杂种胚。少数子房在培养一周后仍能缓慢生长, 2 周后子房表皮逐渐退绿, 呈黄白色水渍状, 子房内隐约可见大小约 0.5 mm 的深色点状物。数天后点状物长出子房, 发育为具两片绿色子叶的幼芽。切下绿色幼芽继代培养, 获得 4 枚杂种幼苗(表 2)。为了考察深色点状物的起源, 解剖了部分具深色点状物的杂交子房, 发现深色点状物为子房内的带有两片子叶的裸胚。因此, 本文将由深色点状物发育出的绿色幼芽称为胚性芽。解剖出子房内尚未长出一枚绿色裸胚和 4 枚绿色胚珠, 转移至新鲜培养基培养, 但均逐渐变褐死亡。

将 4 枚胚性苗转移至含 6-BA 的 A₂ 培养基后, 幼苗逐渐长出了较多的腋芽。使用 A₂ 培养基对杂种苗作腋芽快速繁殖, 获得了拥有数百株幼苗的杂种无性系。

用酯酶同工酶初步检测出杂种苗具双亲的部分特征。用分布在甘蓝型油菜核基因组 19 个连锁群上的 DNA 片段克隆作探针检测了杂种和双亲的 RFLP, 获得的每一份 DNA 指纹图

表 1 子房培养和腋芽繁殖用的培养基编号和成分

Table 1 Abbreviations and elements of media for ovary culture and axillary shoot propagation

培养基代码 Abbr. for the media	基本培养基 Basic medium	蔗 糖 Sucrose %	6-BA mg/L	NAA mg/L	酵母浸膏 Extract of yeast g/L
A	MS	2	0	0	0
A ₁	MS	2	2	0	0
A ₂	MS	2	5	0	0
B	MS	3	0	0	0
B ₁	MS	3	2	0.2	2
C	MS	4	0	0	0
C ₁	MS	4	2	0.2	2

表2 *Moricandia arvensis* × 甘蓝型油菜的子房培养
Table 2 Ovary culture of *Moricandia arvensis* × *Brassica napus*

甘蓝型油菜亲本 Parent of <i>B. napus</i>	培养基 Medium	培养子房数 No. of cultured ovary	具深色小点子房数 No. of ovaries with dark points	培养胚性芽数 No. of cultured embryonic shoots	获杂种幼苗数 No. of hybrid shoots obtained	杂种苗编号 Abbr. for the hybrid shoots
Express	A	10	0	0	0	-
	C ₁	7	4	6	2	ME-1, ME-2
	B ₁	9	0	0	0	-
Libravo	A	19	5	2	2	ML-1, ML-2
	B ₁	32	0	0	0	-
	C ₁	26	0	0	0	-
合计 Total		103	9	8	4	

谱均表明杂种具双亲的特征带纹(图版 1-1)。当用线粒体 DNA 片段克隆作探针时, 杂种则仅具母本 *M. arvensis* 的 RFLP 特征带纹(图版 1-2)。检测了杂种根尖染色体数目, 发现杂种体细胞多具 33 条染色体, 为 *M. arvensis* ($n=14$) 和甘蓝型油菜 ($n=19$) 性细胞染色体数目之和(图版 1-5)。这些结果均表明, 我们所获得的杂种是 *M. arvensis* 的卵细胞与甘蓝型油菜的精细胞受精的产物。

2.2 属间杂种的生物学特性

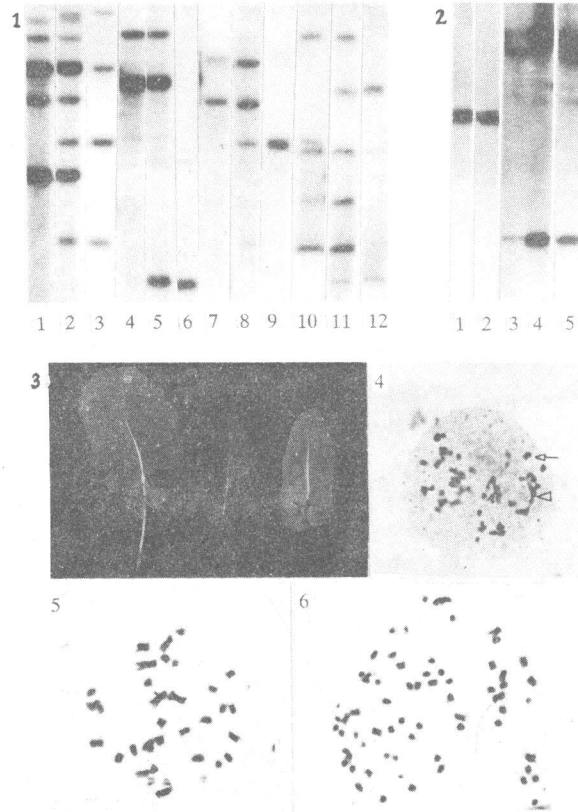
4 个杂种中, 仅 ML-1 具有较强的活力, 并且无需春化就能开花, 其它 3 个无性系的植株在室外均不能正常生长。在形态学特性上, 杂种的某些性状偏向一个亲本, 而另一些性状则偏向另一个亲本。如 F₁ 植株的叶片有柄, 颜色浓绿, 具羽状裂刻, 无肉质化, 更象父本甘蓝型油菜的叶片, 明显不同于母本 *M. arvensis* 的无柄, 灰绿色, 无裂刻, 肉质化的叶片(图版 1-3)。杂种植株的株型为半匍匐生长型, 并且分枝多, 每个花序上的花蕾数较少, 这和母本 *M. arvensis* 很相似。杂种花的形态居于双亲之间, *M. arvensis* 的花为紫色, 甘蓝型油菜的花为黄色, 而杂种的花为浅黄色。ML-1 经加倍后得到的双二倍体植株较 ML-1 高大, 花瓣和叶片也较大, 很容易与 ML-1 区分开。

以红外气体分析仪测定了杂种和双亲植株叶片的 CO₂ 补偿点。对植株 ME-1 的光合特性检测表明, 植株的 CO₂ 补偿点较高, 与甘蓝型油菜亲本相当, 其强光, 弱光下的 CO₂ 补偿点比值也与甘蓝型油菜亲本类似(表 3)。这似乎表明在光合途径这一特性上 C₃ 为显性, 而 C₃-C₄ 为隐性。

杂种花粉母细胞减数分裂时有二价体和多价体形成(图版 1-4)。植株开花时花药皱缩, 很少有可育的花粉, 自交不结实。甘蓝的花粉在杂种柱头上不能萌发。授以白菜型油菜花粉后, 观察到花粉在杂种柱头上萌发和花粉管穿入花柱的情形, 但仍不能产生后代, 似乎表明杂种雌性亦不育。杂种苗经秋水仙素处理后, 至少有一棵加倍为双二倍体, 其体细胞具有期望的 66 条染色体(图版 1-6)。但双二倍体的花粉育性未能得到明显改善, 仍然雄性不育。因受开花季节(夏季)的限制, 尚未用合适的花粉源测验双二倍体的雌性育性。

3 讨论

运用子房培养技术进行植物远缘杂种胚挽救的常规方法, 通常是在子房培养一段时间后, 解剖子房取出胚珠中的将要停止发育的胚, 进行胚培养。有时胚珠发育不良, 杂种胚长



图版说明: 1. 杂种及其亲本核 DNA 的 RFLP 分析。图中第 1, 4, 7, 10 道为甘蓝型油菜亲本 Express, 第 2, 5, 8, 11 道为属间杂种, 第 3, 6, 9, 12 道为 *M. arvensis*。第 1, 2, 3 道, 第 4, 5, 6 道, 第 7, 8, 9 道和第 10, 11, 12 道所用的探针和酶分别为 pW130/*EcoRV*, pW177/*EcoRV*, pW180/*EcoRI* 和 pW203/*EcoRI*。

2. 杂种及其亲本线粒体 DNA 的 RFLP 分析。图中第 1, 2 道为甘蓝型油菜亲本 Express 和 Libravo, 第 3, 4 道为属间杂种, 第 5 道为 *M. arvensis*。所用的探针和酶是 *atp9/EcoRV*。

3. 杂种及其亲本的叶片形态。左: 甘蓝型油菜亲本 Libravo, 中: 属间杂种, 右: *M. arvensis*。

4. 杂种花粉母细胞减数分裂中期, 带尾的空心小箭头示二价体, 空心大箭头示多价体。

5. 示属间杂种 ML-1 的幼嫩子房体细胞具 33 条染色体。

6. 示加倍后属间杂种 ML-1 的幼嫩子房体细胞具 66 条染色体。

Plate 1: 1. RFLP analysis of total DNA from hybrids and their parents. Lane 1, 4, 7, 10; a variety of *B. napus*, Express; Lane 2, 5, 8, 11; intergeneric hybrid; Lane 3, 6, 9, 12; *M. arvensis*. Lane 1, 2, 3; *EcoRV* digested and hybridized with pW130 probe; Lane 4, 5, 6; *EcoRV*/pW177; Lane 7, 8, 9; *EcoRI*/pW180; Lane 10, 11, 12; *EcoRI*/pW203.

2. RFLP analysis of mtDNA from hybrids and their parents. Lane 1, 2; varieties of *B. napus*, Express and Libravo; Lane 3, 4; hybrids between *M. arvensis* and *B. napus* varieties, Express and Libravo respectively; Lane 5; *M. arvensis*. *EcoRV* digested, hybridized with probe *atp9*.

3. Leaf morphology of the intergeneric hybrid and its parents. Left; Express, a variety of *B. napus*; middle; the hybrid between Express and *M. arvensis*. Right; *M. arvensis*.

4. A pollen mother cell of the hybrid at metaphase I of meiosis. A bivalent was showed by a small hollow arrow and a multivalent was showed by a large hollow arrowhead.

5. Shown 33 chromosomes in a somatic cell of young ovary of the intergeneric hybrid, ML-1.

6. Shown 66 chromosomes in a somatic cell of young ovary of the amphidiploid, chromosome doubled ML-1.

表3 属间杂种的光合特性
Table 3 Photosynthetic feature of the hybrid

	CO ₂ 补偿点(τ) CO ₂ compensation point	弱光/强光的 τ 比值 Ratio of the low light/high light
<i>M. arvensis</i>	16.17	0.5
<i>B. napus</i>	42.78	0.92
杂种 Hybrid ME-1	42.00	0.93

出胚珠裸露在胎座上,形成裸胚,也能培养成苗^[8](孟金陵等,未发表)。在我们的试验中,不仅出现了裸胚,还出现了长出子房壁的小绿苗。杂种胚长出子房形成绿色幼苗的现象尚未见报道。我们暂且称这种幼苗为胚性芽(embryonic shoot)。胚性芽是在子房已退化变为水渍状,而杂种胚仍具相当活力状况下产生的。由于胚性芽具分化了的绿色子叶、生长点和伸长的下胚轴,切下后在培养基上较易成活。适时从子房壁上取下胚性芽进行培养,是植物胚挽救的另一种形式。

种属间杂种不育主要有染色体不育、基因不育和细胞质不育3种类型,其中最常见的是异源染色体在减数分裂时不能正常配对的染色体不育^[1,12]。Takahata和Takeda(1990)报道的*M. arvensis*与白菜、甘蓝和黑芥的有性杂种,花粉母细胞减数分裂时均出现较多的单价体,植株表现花药干瘪,无花粉和不育^[14]。在我们的试验中,4个F₁无性系植株均不育,似乎也主要归咎于染色体不育。将属间杂种染色体数加倍获得双二倍体,应是克服染色体不育的有效途径。Bang等(1996)在*M. arvensis*与萝卜的杂交中,其F₁花粉育性为1.9%,将杂种加倍为双二倍体后,花粉育性提高到66.6%^[5]。但我们获得的杂种加倍为双二倍体后,雄性育性亦未得到明显改善。这似乎表明基因不育或细胞质不育也是本试验中F₁不育的一个重要原因。我们将加倍为双二倍体的杂种苗进行了腋芽无性繁殖,希望在下一个生长季节用甘蓝型油菜、白菜或甘蓝适宜品种的花粉与其交配,以克服基因不育或细胞质不育。

C₃性状在属间杂种一代呈显性这一遗传特点,使得从*Moricandia*属中向芸薹属作物转移C₃-C₄特性这一愿望变得十分困难。这意味着即使人们获得了可育的杂种后代,通过回交选择等途径消除了*M. arvensis*的绝大部分遗传累赘后,由于C₃-C₄基因被芸薹属物种的相关基因所掩盖,亦不会表现C₃-C₄性状。人们还必须在杂种后代中诱导部分同源染色体配对并发生交换,以将控制C₃性状的显性基因排除。Takahata(1990)和Takahata与Takeda(1990)在*M. arvensis*与甘蓝、白菜的有性杂种花粉母细胞减数分裂中,分别观察到2.67和2.17个二价体,我们在*M. arvensis*×甘蓝型油菜的性细胞中也观察到了二价体和多价体的形成,表明*M. arvensis*与芸薹属A、C基因组的染色体有较高的同源性。因此,在携有C₃-C₄基因的染色体节段诱导同源配对和交换是可能的。看来,创造具有C₃-C₄光合途径的芸薹属作物新类型,还需要长期大量的创造性工作。

参 考 文 献

- 1 孟金陵, 1995, 植物生殖遗传学, 科学出版社, 北京, 340~350
- 2 孟金陵、甘莉, 1998, 植物学报, 40(5)
- 3 孟金陵, A. Sharpe, A. C. Bowman等, 1996, 遗传学报, 23, 293~306
- 4 Apel, P., H. Bauwe, H. Ohle, 1984, Biochem. Physiol. Pflanz, 179, 793~797
- 5 Bang, S. W., Y. Kaneko, Y. Matsuzawa, 1996, Plant Breeding, 115, 385~390
- 6 Calvin, D. T., 1990, In: Dennis, D. T., Turpin, D. H. eds., Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, London: Longman Scientific & Technical pp. 253~273

- 7 Holaday, A. S., A. T. Harrison, R. Chollet, 1982, *Plant Sci. Lett.*, 27, 181~189
- 8 Inomata, Z., 1979, *Japan J. Breed.*, 24(2), 115~120.
- 9 Kirti, P. B., S. B. Narashimhulu, S. Prakash et al., 1992, *Plant Cell Rep.* 11, 318~321
- 10 O'Neill, C. M. O., T. Murata, C. M. Morgan et al., 1996, *Theor. Appl. Genet.* 93, 1234~1241
- 11 Rawsthorne, S., 1992, *The Plant Journal*, 2(3), 267~274
- 12 Rieger, R., A. Michaelis, M. M. Green, 1976, *Glossary of Genetics and Cytogenetics*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 285~286
- 13 Takahata, Y., 1990, *Euphytica*, 46, 259~264
- 14 Takahata, Y., T. Takeda, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 80, 38~42
- 15 Takahata, Y., T. Takeda, N. Kaizuma, 1993, *Euphytica*, 69, 155~160
- 16 Toriyama, K., K. Hinata, T. Kameya, 1987, *Plant Sci*, 48, 123~128
- 17 Warwick, S. I., L. D. Black, 1993, *Can. J. Bot.* 71, 906~918

Studies on Obtaining Intergeneric Hybrids of *Moricandia arvensis* × *Brassica napus* and Their Biological Characteristics

Meng Jinling Yan Zhun Gan Li

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract Four intergeneric hybrids between C_3 - C_4 intermediate wild *Moricandia arvensis* and C_3 -typed *Brassica napus* were obtained via ovary culture and the embryonic shoots rescue when *M. arvensis* was used as the female parents. The hybrid population was enlarged after axillary shoots propagation *in vitro*. RFLP analysis showed that the nuclei DNA of the hybrid had fingerprint of both parents but the mitochondria DNA of the hybrid had only that of the maternal parent, *M. arvensis*. The somatic cells of the hybrid had 33 chromosomes as expected. Although the hybrid had morphologically intermediate characters between their parents on most traits, the hybrid was similar to one parent on some traits and tended to another parent on other traits. In general, the hybrid was semi-creepy with yellow flowers, and showed a C_3 photosynthetic pathway according to its CO_2 compensation point. The meiosis of pollen mother cells of the hybrid was abnormal and multivalents were observed. The hybrid was sterile on both male and female sides. The amphidiploid derived from the hybrid was also male sterile. Further work on the introduction of C_3 - C_4 gene into the genome of *Brassica* crops was discussed.

Key words *Moricandia arvensis*; *Brassica napus*, C_3 - C_4 ; Embryonic shoots; Intergeneric hybrid; Biological characteristics