

白芥×甘蓝 F₁ 代及 BC₁ 代单体异附加系的 GISH 分析

魏文辉* 张苏锋 李均 王力军 陈波 方小平* 王转 罗莉霞

(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; 信阳师范学院生命科学院, 信阳 464000.

* 联系人, E-mail: whwei@oilcrops.cn, xpfang@public.wh.hb.cn)

摘要 以白芥(*Sinapis alba* L)为母本, 甘蓝(*Brassica oleracea* var *alboglabra*)为父本进行属间杂交, 获得了不育及半不育的两种 F₁ 植株, 再以半不育的 F₁ 植株作母本, 甘蓝作父本进行回交, 获得了 BC₁ 植株. 利用基因组原位杂交(genomic *in situ* hybridization, GISH), 结合双色荧光原位杂交(dual-colour fluorescence *in situ* hybridization, dcFISH)技术, 鉴定出不育 F₁ 植株有 21 条染色体, 其中 9 条来自甘蓝, 12 条来自白芥, 属含 1 套甘蓝染色体及 1 套白芥染色体的预期杂种; 半不育 F₁ 植株有 30 条染色体, 其中 18 条来自甘蓝, 12 条来自白芥, 属含 2 套甘蓝染色体及 1 套白芥染色体的非预期杂种, 其花粉母细胞(PMC)减数分裂中期 最多出现 3 个 C-S 三价体, 减数分裂后期 白芥染色体出现不同的分离比例. GISH 分析结果表明, 从 BC₁ 植株中鉴定出了 1 株甘蓝-白芥单体异附加系, 其有丝分裂中期相有 19 条染色体, 18 条来自甘蓝, 附加的 1 条来自白芥; 减数分裂中期 显示 9 个甘蓝的二价体及 1 个白芥的单价体, 有时白芥的单个染色体与甘蓝的染色体形成了可能的三价体. 甘蓝-白芥单体异附加系的获得为白芥基因渗入、基因定位与克隆奠定了基础.

关键词 甘蓝 白芥 非预期杂种 单体异附加系 基因组原位杂交(GISH) 双色荧光原位杂交(dcFISH)

白芥(*Sinapis alba* L)属十字花科白芥属植物, 高抗十字花科植物多种病害及虫害 [1-6], 也能抗高温及干旱胁迫 [7], 是十字花科植物育种的优良种质资源. 通过属间有性杂交, 已将白芥的叶斑病抗性转入白菜(*Brassica rapa* L)基因组中 [8]. 白芥与甘蓝型油菜(*Brassica napus* L)属间有性杂交已有成功报道 [4,7]. 通过体细胞杂交(或融合)技术, 已获得白芥与甘蓝型油菜 [9,10]、白芥与芥菜型油菜 [11]、白芥与甘蓝 [5] 属间杂种及其后代. 这些杂交实验的目的均是为了将白芥优异目的性状转入其他作物基因组中.

甘蓝是我国最重要的蔬菜作物之一, 经常受到蚜虫、霜霉病、黑斑病及黑腐病等的侵害导致减产, 因此, 如何将白芥这些病虫害抗性转入甘蓝基因组, 扩大我国甘蓝品种的遗传变异性显得日益重要. 为了避免因体细胞杂交产生的嵌合体植株, 我们成功地进行了二者间的有性杂交, 获得了杂种后代, 并进一步将可育杂种与甘蓝回交, 获得了回交一代植株, 对这些植株进行染色体组成鉴定, 将为我们构建甘蓝-白芥单体异附加系提供指导.

基因组原位杂交(genomic *in situ* hybridization, GISH)技术不仅能鉴定远缘杂种中的亲本染色体, 而且能检测其基因组组成及染色体行为 [10,12]. 在鉴定芸薹属植物远缘杂种的基因组组成时, GISH技术的

应用是成功的 [13]. 尽管这一技术在检测芸薹属植物较小基因组片段方面存在一些局限性 [14], 但在细胞减数分裂时期仍可检测到基因组间重排现象 [10,15]. 通过白芥与甘蓝间有性杂交与回交, 我们已获得了大量的杂种一代(F₁)及回交一代(BC₁)植株. 鉴定甘蓝-白芥单体异附加系, 是我们今后进行基因转移、基因定位与克隆的基础.

1 材料与方法

() 实验材料. 以白芥(*Sinapis alba* L, 2n = 24, SS 基因组, 青海地方品种)作母本, 甘蓝(*Brassica oleracea* var *alboglabra*, 2n = 18, CC 基因组, 香港中花芥蓝)作父本进行属间杂交, 未成熟子房在 MS 基本培养基(添加 500 mg/L 水解酪蛋白)中培养至成熟, 剥离的种子继续在 MS 基本培养基中培养出小苗, 无性扩繁后的小苗移至大田生长, 为 F₁ 植株. F₁ 植株有不育及半不育两种, 选择半不育 F₁ 植株作母本, 甘蓝作父本进行回交, 获得了可育无花瓣或缺花瓣的 BC₁ 植株(图 1). 以 F₁ 植株及 BC₁ 植株花蕾为材料, 进行有丝分裂及减数分裂染色体制片.

() 染色体制备. 染色体制片参考 Wei 等人 [16,17] 的方法.

() 基因组 DNA 抽提. 基因组 DNA 抽提参照文献 [18] 的方法.

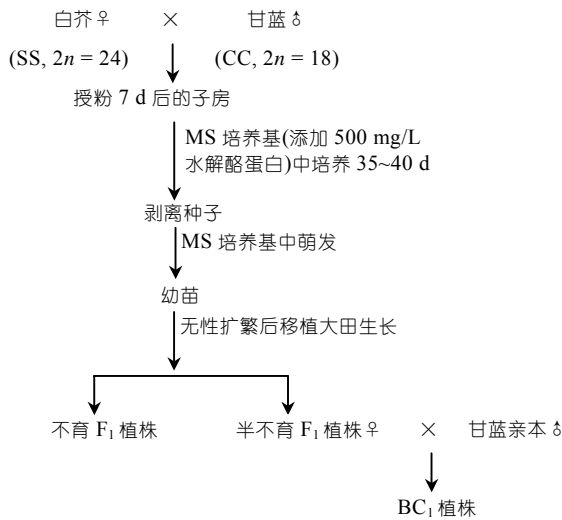


图 1 单体异附加系选育程序

() 探针标记及荧光原位杂交与检测. 白芥基因组DNA用生物素缺刻平移试剂盒标记(catalogue no. 11745824910; Roche, 德国), 甘蓝基因组DNA 用地高辛缺刻平移试剂盒标记(catalogue no. 11745816910; Roche, 德国). 单色荧光原位杂交只用相应的一种探针, 双色荧光原位杂交将两种标记的探针等量混合. 原位杂交参照Wei等人 [16,17,19]的方法, 略加修改. 将染色体制片于 100 μg/mL RNase (2×SSC)中 37 处理 1 h, 然后 70%甲酰胺 70 变性 2~3 min, 立即浸入 -20 的 70%, 95%及 100%乙醇连续脱水, 室温凉干. 杂交混合液(标记探针各 5 ng/μL, 0.5 μg/μL 鲑鱼精子 DNA, 10%硫酸葡聚糖, 50%去离子甲酰胺, 0.1%十二烷基硫酸钠, 2 × SSC)沸水中变性 10 min后立即置于冰上至少放置 10 min以上. 每张变性后的制片加 60 μL 变性杂交混合液, 盖上盖玻片, 90 放置 10 min, 然后 37 杂交过夜. 杂交结果的荧光检测参照 Wei等人 [17]的方法, 检测前退掉盖玻片, 于 20%甲酰胺, 2 × SSC及 0.1× SSC 42 分别处理 10 min. 单色

荧光原位杂交中, 生物素标记的探针用 streptavidin-Cy3 (catalogue no. PA43001; Amersham, 英国)检测, 地高辛标记的探针用 Anti-Digoxigenin-Fluorescein (catalogue no. 1207741; Roche, 德国)检测. 在双色荧光原位杂交中, 将上面两个独立的检测步骤连续完成. 每制片按 1 μL 荧光试剂原液加 50 μL PBS/1% BSA的量配制检测液. 检测液加到制片上后, 盖上盖玻片, 37 温育 30~60 min, PBS浸洗 3×5 min, 加 20 μL 2 μg/mL DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), 盖上盖玻片, Leica DM IRB 荧光显微镜镜检, DFC300 CCD拍照, FW4000 软件叠加图像.

() 花粉活性观察. 上午 9~10 时取新鲜花粉用 1%醋酸洋红进行染色, 观察死、活花粉数, 计算花粉成活率. 花粉成活率(%) = 着色花粉粒数/花粉粒总数 × 100. 每种花粉同一放大倍数下观察 3 个视野, 约 500~1000 粒左右花粉.

2 实验结果

2.1 亲本及 F₁ 植株细胞遗传学分析

GISH-dcFISH 检测结果表明, 杂交亲本白芥有 24 条染色体, 这 24 条染色体在减数分裂中期 形成了 12 个二价体(红色荧光); 杂交亲本甘蓝有 18 条染色体(绿色或蓝绿色荧光)(图 2(a)~(c)). F₁ 植株按照可育性分为两类: 一类植株不育, GISH-dcFISH 鉴定为 21 条染色体, 12 条来自白芥(红色或红白色荧光), 9 条来自甘蓝(绿色或蓝绿色荧光)(表 1, 图 2(d)); 另一类植株约有 20%~30%的花粉可育(半不育), GISH-dcFISH 鉴定为 30 条染色体, 12 条来自白芥, 18 条来自甘蓝(表 1, 图 2(e)和(f)). 半不育 F₁ 植株花粉母细胞(PMC)减数分裂中期 , S 染色体与 C 染色体最多形成了 3 个三价体(表 2, 图 2(g)), 在减数分裂后期 观察到了 S 染色体具有 1 11, 2 10, 3 9, 4 8, 5 7 及 6 6 的分离比例(表 2, 图 2(h)和(i)).

表 1 GISH-dcFISH 鉴定的亲本、F₁ 及 BC₁ 植株染色体组成及其部分表型

基因型	花粉与花瓣	染色体数目	基因组组成	染色体来源	
				甘蓝	白芥
甘蓝		18	CC	18	
白芥		24	SS		24
F ₁ (白芥♀ × 甘蓝♂)	不育, 花瓣正常	21	CS	9	12(10) ^{a)}
	约 20%~30%花粉可育, 花瓣正常	30	CCS	18	12(2)
C ₁ (可育 F ₁ ♀ × 甘蓝♂)			CCS(1~12)		
BC ₁ -1(MAAL-1)	约 70%~80%花粉可育, 无花瓣或缺花瓣			18	1(1)

a) 括号中数字表示检测出的株数

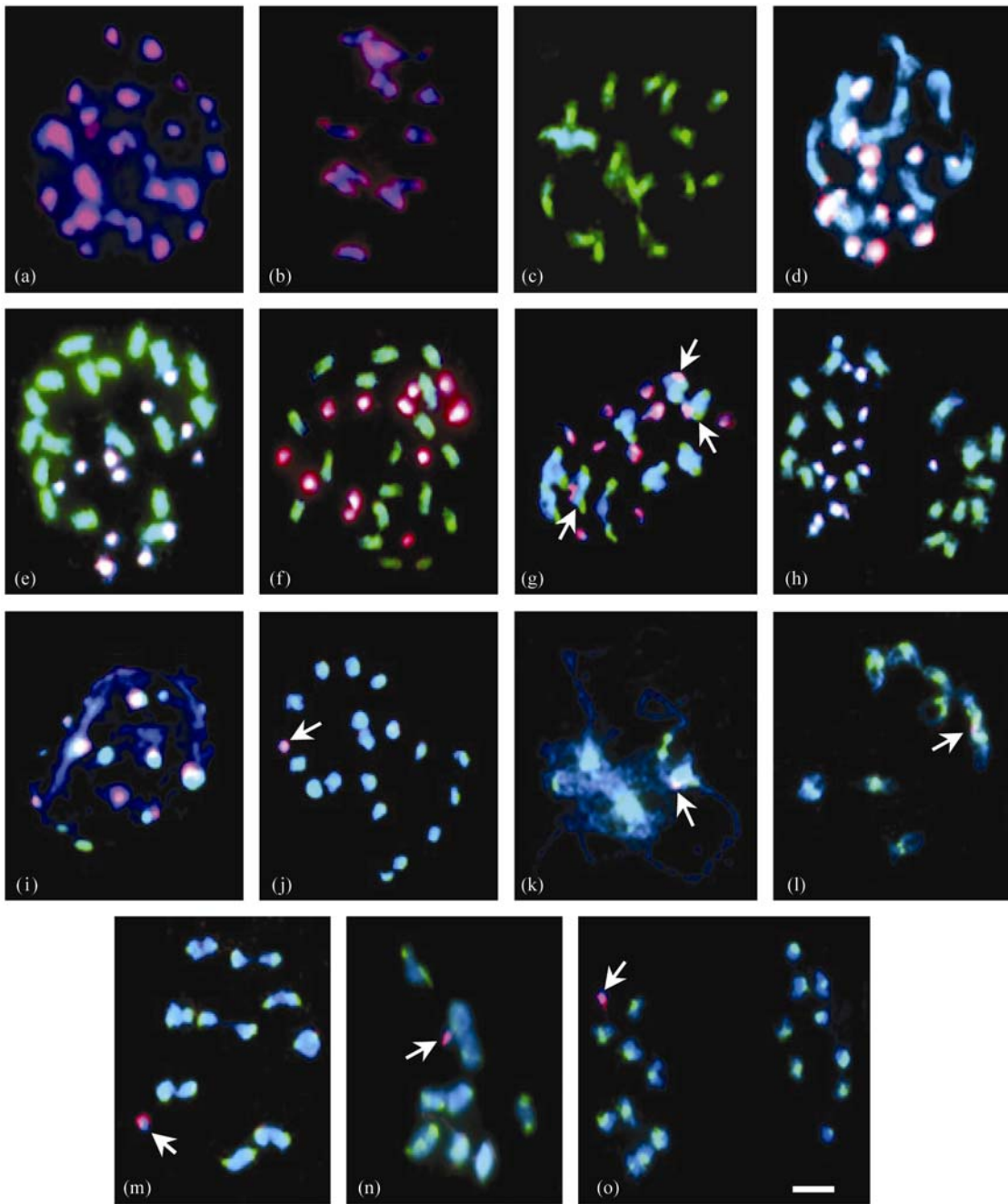


图2 杂交亲本、F₁及单体异附加系染色体组成或行为的 GISH-dcFISH 鉴定

白芥的染色质被 Cy3 显示为红色或红白色, 甘蓝的染色质被 Fluorescein 显示为绿色或蓝绿色。(a)~(c) 亲本植株。(a) 白芥有丝分裂中期显示 24 条染色体;(b) 白芥减数分裂中期 显示 12 个二价体;(c) 甘蓝有丝分裂中期显示 18 条染色体。(d)~(i) F₁ 植株。(d) 不育 F₁ 植株有丝分裂中期显示 21 条染色体, 其中 9 条染色体来自甘蓝, 12 条染色体来自白芥;(e)和(f) 半不育 F₁ 植株有丝分裂中期显示 30 条染色体, 其中 18 条染色体来自甘蓝, 12 条染色体来自白芥;(g) 花粉母细胞减数分裂中期 显示甘蓝 18 条染色体排列在赤道板上并优先配对, 白芥 9 条染色体形成单价体, 其余 3 条染色体与 C 染色体分别形成可能的 3 个三价体;(h) 减数分裂后期 显示 S 染色体 1-11 的分离;(i) 减数分裂末期 显示 8 个 S 染色体。(j)~(o) 单体异附加系 (MAAL)。(j) 有丝分裂中期显示 19 条染色体, 其中 18 条来自甘蓝, 1 条附加的染色体来自白芥;(k) 减数分裂粗线期显示 S 与 C 染色体间的联会;(l) 减数分裂双线期显示 C 染色体形成 9 个二价体, 1 个推测的 C-S 三价体;(m) 减数分裂中期 显示 C 染色体形成 9 个二价体, S 染色体形成 1 个单价体;(n) 减数分裂中期 显示 C 染色体形成 9 个二价体, 1 个推测的 C-S 三价体;(o) 减数分裂后期 显示 C 染色体 9-9 的分离, S 染色体 1-0 的分离。(a)~(o) 放大倍率相同, 标尺为 5 μm。箭头所示为信号位点

表 2 F₁ 植株花粉母细胞减数分裂染色体行为的 GISH-dcFISH 分析

减数分裂	减数分裂中期 花粉母细胞三价体数目			减数分裂后期 白芥染色体分离比例					
	1	2	3	1:11	2:10	3:9	4:8	5:7	6:6
计数的花粉母细胞数目	27	35	9	2	7	10	11	17	15
所占比例(%)	38.0	49.3	12.7	3.2	11.3	16.1	17.7	27.4	24.2

2.2 BC₁ 植株中单体异附加系的细胞遗传学分析

对 BC₁ 植株进行 GISH-dcFISH 分析, 发现了 1 株甘蓝-白芥单体异附加系(monosomic alien addition line, MAAL), 即在 18 条甘蓝 C 染色体中附加了 1 条白芥的 S 染色体. 有丝分裂中期可以清楚地观察到附加的 1 条 S 染色体, 为红色荧光, 其余 18 条甘蓝的染色体显绿色或蓝绿色荧光(图 2(j)). 对单体附加系减数分裂时期染色体行为进行研究, 在减数分裂粗线期(图 2(k))、双线期(图 2(l))、中期(图 2(m)和(n))、后期(图 2(o))均检测到了附加的这一 S 染色体. 这 1 条 S 染色体与 C 染色体有时形成三价体, 有时以单价体形式独立存在.

2.3 BC₁ 植株中单体异附加系的形态学特征

BC₁ 植株中的白芥染色体单体异附加系的很多形态学特征与父本甘蓝类似, 很难看到母本白芥的一些典型特征(叶裂、叶毛等)(图 3(a), (c), (d)). 但单体异附加系植株形态特征与甘蓝也存在一些差异, 主要表现在叶片细长、基部有小裂片、基生叶叶柄基部有叶耳(图 3(a), (d)); 单体异附加系的分枝能力强, 分枝多, 类似白芥(图 3(a), (c), (d)); 花蕾比甘蓝的小些, 萼片黄绿色(芥蓝为绿色), 无花瓣或缺花瓣(图 3(b)); 花粉育性比甘蓝低, 单体异附加系花粉育性 77.4%, 甘蓝为 97.6%.

3 讨论

通过有性杂交, 本研究获得了白芥与甘蓝的 F₁

杂种, 如果 F₁ 杂种染色体没有加倍, 应有 21 条染色体, 如果被化学药物诱导加倍, 就应有 42 条染色体. 然而, 检测结果表明, F₁ 植株除了存在预期的具有 21 条染色体的杂种(含有双亲的各 1 套染色体)外, 还存在具有 30 条染色体的特殊情况. GISH-dcFISH 结果显示, 其基因组中具有 2 套甘蓝染色体及 1 套白芥染色体, 显然它们属于非预期杂种. 我们认为这种非预期杂种是由于甘蓝 PMC 产生的未减数雄配子与白芥正常雌配子结合后产生的, 其他研究者也曾经观察到甘蓝 PMC 产生未减数雄配子的现象 [20]. 未减数雌雄配子的产生几率尽管很低, 但它们确实在芸薹属植物中偶然发生 [21,22]. 白芥与甘蓝间 F₁ 代非预期杂种植株的发现, 使我们在回交一代(BC₁)就能够获得甘蓝-白芥单体异附加系, 这加快了获得全套甘蓝-白芥单体异附加系的进程. 在前人构建单体异附加系的实验中, 只有到回交二代(BC₂)才可能获得单体异附加系 [10,11,23]. 本研究获得的这一单体异附加系其细胞质属于白芥, 核基因组基本属于甘蓝(18 条染色体来自甘蓝, 1 条染色体来自白芥), 约有 70%~80% 花粉可育, 并未出现核质互作不育现象, 随着今后更多这种不同核质的单体异附加系的获得, 是否会出现核质互作不育现象还有待于进一步观察和研究.

在 F₁ 及 BC₁ 植株花粉母细胞减数分裂时期, S 染色体与 C 染色体之间均可能发生了联会形成三价体, 这进一步显示二者基因组之间存在一定的同源性, 染色体间会出现重排现象 [10], 使白芥基因组成分可



图 3 甘蓝-白芥单体异附加系形态特征
(a) 单体异附加系花期植株; (b) 单体异附加系花序; (c) 母本白芥; (d) 父本甘蓝

以转移到甘蓝基因组中,从而将白芥的一些优异性状转移到甘蓝中,达到对甘蓝进行遗传改良的目的。

在BC₁植株中发现的这一单体异附加系植株(MAAL-1)表现为无花瓣或缺花瓣,分枝能力强,意味着附加的这一白芥S染色体上携带有抑制花瓣形成的基因及促进分枝的基因,因此,单体异附加系的获得是定位控制某种性状重要功能基因的有效途径。在单体异附加系PMC中期,单个S染色体通常以单价体方式独立存在,比甘蓝的二价体明显要小,极易识别,这为显微分离这一特定S染色体提供了便利。显微分离并收集多个拷贝的同一染色体,就容易通过LA-PCR(linker-adaptor polymerase chain reaction)或DOP-PCR(degenerate oligonucleotide primer polymerase chain reaction)扩增特定染色体DNA,构建其染色体文库,筛选新的染色体特异的分子标记,从而增加遗传图谱中分子标记的密度^[24,25]。我们正在对单体异附加系的小孢子进行加倍,以期获得纯合稳定的二体异附加系。纯合稳定二体异附加系的获得,将为遗传图谱的构建及图位克隆花瓣发育及分枝等相关功能基因奠定基础,也将在拓宽人工合成油菜种质资源遗传多态性领域发挥重要作用^[26]。

致谢 本工作为中国农业科学院油料作物研究所所长基金(批准号:200301)、湖北省杰出青年基金(批准号:2005ABB028)及武汉市青年科技晨光计划(批准号:20045006071-37)资助项目。

参 考 文 献

- Salisbury P A. Blackleg resistance in weedy crucifers. *Cruciferae Newslett Eucarpia*, 1987, 12: 90—92
- Muehlchen A M, Parke J L. Evaluation of crucifer green manures for controlling *Aphanomyces* root rot of peas. *Plant Dis*, 1990, 74: 651—654
- Golinowski W, Magnusson C. Tissue response induced by *Heterodera schachtii* (Nematoda) in susceptible and resistant white mustard cultivars. *Can J Bot*, 1991, 69: 53—62
- Lelivelt C L C, Leunissen E H M, Frederiks H J, et al. Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm) from *Sinapis alba* L (white mustard) to the *Brassica napus* L gene pool by sexual and somatic hybridization. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 688—696
- Hansen L N, Earle E D. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L and *Sinapis alba* L with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 1078—1085[DOI]
- Brown J, McCaffrey J P, Brown D A, et al. Yield reduction in *Brassica napus*, *B. rapa*, *B. juncea*, and *Sinapis alba* caused by flea beetle (*Phyllotreta cruciferae* (Goeze) (Coleoptera: Chrysomelidae)) infestation in northern Idaho. *J Econ Entomol*, 2004, 97: 1642—1647
- Brown J, Brown A P, Davis J B, et al. Intergeneric hybridization between *Sinapis alba* and *Brassica napus*. *Euphytica*, 1997, 93: 163—168[DOI]
- Gong Z H, He Y K, Wang M. Studies on the resistance of intergeneric hybrids of Chinese cabbage × white mustard to *Alternaria* leaf spot. *Acta Hort Sin*, 1994, 21: 401—403
- Wang Y P, Sonntag K, Rudloff E, et al. Intergeneric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Sinapis alba*. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47: 84—91
- Wang Y P, Zhao X X, Sonntag K, et al. Behaviour of *Sinapis alba* chromosome in a *Brassica napus* background revealed by genomic *in situ* hybridization. *Chromosome Res*, 2005, 13: 819—826[DOI]
- Gaikward K, Kirti P B, Sharma A, et al. Cytogenetical and molecular investigations on somatic hybrids of *Sinapis alba* and *Brassica juncea* and their backcross progeny. *Plant Breed*, 1996, 115: 480—483[DOI]
- Ji Y, Pertuze R, Chetelat R T. Genomic differentiation by GISH in interspecific and intergeneric hybrids of tomato and related nightshades. *Chromosome Res*, 2004, 12: 107—116[DOI]
- Benabdelmouna A, Guéritaine G, Abirached-Darmency M, et al. Genome discrimination in progeny of interspecific hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus raphanistrum*. *Genome*, 2003, 46: 469—472[DOI]
- Snowdon R J, Köhler W, Friedt W, et al. Genomic *in situ* hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 1320—1324[DOI]
- Wang Y P, Snowdon R J, Rudloff E, et al. Cytogenetic characterization and *fae 1* gene variation in progenies from asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. *Genome*, 2004, 47: 724—731[DOI]
- Wei W H, Qin R, Song Y C, et al. Location and analysis of introgressed segments in the parthenogenetic progenies of *Zea mays* × *Z. diploperennis* by GISH. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 373—376
- Wei W H, Zhao W P, Wang L J, et al. Karyotyping of *Brassica napus* L based on C₀t-1 DNA banding by fluorescence *in situ* hybridization. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47: 1479—1484[DOI]
- Doyle J J, Doyle J I. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1988, 12: 13—15
- Wei W H, Zhao W P, Song Y C, et al. Genomic *in situ* hybridization analysis for identification of introgressed segments in alloplasmic lines from *Zea mays* × *Zea diploperennis*. *Hereditas*, 2003, 138: 21—26[DOI]
- Inomata N. A cytogenetic study of the progenies of hybrids between *Brassica napus* and *Brassica oleracea*, *Brassica bourgeauii*, *Brassica cretica* and *Brassica montana*. *Plant Breed*, 2002, 121: 174—176[DOI]
- Heyn F W. Analysis of unreduced gametes in the *Brassicaceae* by crosses between species and ploidy levels. *Z Pflanzenzüchtg*, 1977, 78: 13—39
- Ayotte R, Harney P M, Souza Machado V. The transfer of triazine resistance from *Brassica napus* L to *B. oleracea* L. Morphology, fertility and cytology of the F₁ hybrid. *Euphytica*, 1988, 37: 189—197[DOI]
- Peterka H, Budahn H, Schrader O, et al. Transfer of resistance against the beet cyst nematode from radish (*Raphanus sativus*) to rape (*Brassica napus*) by monosomic chromosome addition. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 30—41[DOI]
- Li G H, Liu W S, Takasuga A, et al. Characterization and RH mapping of bovine microsatellites generated from a microdissected BTA20-specific DNA library. *Anim Genet*, 2005, 36: 146—151[DOI]
- Fominaya A, Linares C, Loarce Y, et al. Microdissection and microcloning of plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 109: 8—14[DOI]
- 李俊, 方小平, 王转, 等. 外源基因定向插入甘蓝型油菜C基因组. *科学通报*, 2006, 51(12): 1406—1412 (2006-08-01 收稿, 2006-09-11 接受)