

甘蓝型油菜与甘蓝种间杂种的鉴定及特性研究

吴红美 徐跃进 万正杰

华中农业大学园艺林学院/园艺植物生物学教育部重点实验室/国家蔬菜改良中心华中分中心, 武汉 430070

摘要 采用新型甘蓝型油菜细胞质雄性不育源(Eru CMS)为材料, 通过杂交与胚抢救技术, 获得甘蓝型油菜与甘蓝的种间杂种, 对杂种进行鉴定并对杂种性状进行研究。用流式细胞仪和染色体计数鉴定后发现, 真杂种的DNA含量为两亲本的中间值, 并且染色体数目均为28条。通过对真杂种特性进行研究, 结果表明: 杂种植株幼苗形态都介于亲本之间, 生长期则偏向甘蓝型油菜, 具有超亲本的杂种优势; 叶片结构出现了变异, 而绿叶杂种的叶片结构介于亲本之间; 杂种的气孔保卫细胞叶绿体数量、初花期和花器官形态也都介于亲本之间; 杂种具有自身特异的过氧化物同工酶酶带; 杂种不育株率和不育度均为100%, 花粉无活力, 以甘蓝为轮回亲本与杂种回交仍存在杂交障碍, 需借助胚抢救技术获得回交1代。

关键词 甘蓝型油菜; 甘蓝; 种间杂种; 杂种鉴定; 杂种性状

中图分类号 S 635.103.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0290-05

雄性不育是甘蓝杂种优势利用的基础, 前人对此研究较多^[1-4], 但目前所获得的4种主要甘蓝雄性不育类型存在不同程度的缺点^[5]。甘蓝型油菜Eru CMS是一种新的雄性不育材料, 苗期遇低温不黄化, 蜜腺正常, 不育度和不育株率均为100%, 其花药的败育主要发生在单核靠边期至双核期, 但雌蕊的发育正常, 能够正常结实, 是一种优良的不育源。通过远缘杂交和核代换, 可将甘蓝型油菜中的不育基因转移到甘蓝中, 获得雄性不育甘蓝杂种, 拓宽甘蓝雄性不育利用的途径。由于远缘杂交存在杂交障碍, 人工杂交较难成功, 故需借助胚抢救技术获得杂种, 前人已成功获得一些种间杂种^[6-7], 也获得普通甘蓝型油菜与羽衣甘蓝、花椰菜少量的种间杂种种子^[8-9], 并且甘蓝型油菜(Eru CMS)雄性不育基因也成功转入红菜薹, 其后代不育性稳定, 性状表现较好^[10-11]。

本试验在利用胚抢救技术获得甘蓝型油菜Eru CMS与甘蓝种间真杂种的基础上, 对能正常生长的杂种植株(绿叶、花叶杂种)与亲本的部分农艺性状、杂种的育性及生化特性进行研究, 旨在为进一步了解杂种的特性并为创造更多育种的中间材料提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

母本为新型甘蓝型油菜雄性不育材料Eru CMS, 由国家油菜武汉改良分中心提供; 父本为结球甘蓝(田间表现抗虫), 由华中农业大学国家蔬菜改良中心华中分中心提供。

1.2 胚抢救获得杂种及回交1代

采用胚抢救技术获得远缘杂种; 以真杂种为母本, 甘蓝为轮回亲本, 按前期杂种最优抢救方法^[12]稍加改良(子房培养基添加2 g/L活性炭, 其余不变), 获得回交1代。

1.3 杂种鉴定

1) 流式细胞仪法鉴定。采用德国Partec公司的AP流式细胞仪检测^[12]。

2) 子房染色体数目观察。剥取杂种幼嫩的子房(3.0~3.5 mm), 用0.002 mol/L 8-羟基喹啉处理3.5 h, 经卡诺氏固定液($V_{乙醇} : V_{冰醋酸} = 3 : 1$)固定24 h, 4℃保存于70%乙醇中。观察时, 于60℃下用1 mol/L HCl解离10 min, 移置载玻片, 加10%改良的苯酚品红溶液染色。选染色体形态好、分散开的细胞于Olympus CX41显微镜(10×100)下拍照记录。

收稿日期: 2010-07-13

基金项目: 农业部“948”项目(2008-Z26)和湖北省科技攻关项目(20066109)

吴红美, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜遗传育种. E-mail: wuwei851212@mail.hzau.edu.cn

通讯作者: 徐跃进, 教授, 研究方向: 蔬菜遗传育种. E-mail: xyjho@mail.hzau.edu.cn

3) 叶片结构观察。借助徒手切片方法,于 Olympus CX41 显微镜(10×10)下观察。

4) 气孔保卫细胞叶绿体数量观察。取 F_1 -1、 F_1 -2、 F_1 -3 杂种与亲本植株的第 5 片新鲜叶,参照文献[13]方法,于显微镜(10×40)下观察计数各 300 个气孔。

5) 花粉活力测定。随机选取 F_1 -1、 F_1 -2、 F_1 -3 杂种植株与甘蓝的 3 个单株,每株各取 1 个花序,每花序取 3 个接近开放的花蕾,每个花蕾中各取 3 个花药,于载玻片上,用镊子捣碎,醋酸洋红染色 2 min,除去载玻片上的杂质,镜检。无活力花粉被染成浅褐色或不着色,有活力的被染成红色。各观察视野 50 个,于显微镜(10×10)下拍照,花期连续观察多次。

6) 过氧化物同工酶分析。取 F_1 -1、 F_1 -2、 F_1 -3 杂种植株与亲本的第 8 片嫩叶以及对应植株花蕾各 0.15 g,于 PBS(pH 7.8)冰浴上提取,4 °C、14 000 r/min 离心 20 min,取上清。采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,POD 分离胶 7.5%,浓缩胶 4%,电极缓冲液 Tris-Gly(pH8.8)。染色方法为联苯胺法。

2 结果与分析

2.1 种间杂种的获得

采用胚抢救技术手段共获得 19 株幼苗,经流式细胞仪初步测定获得 11 株杂种苗^[12]。子房培养获得 3 株杂种苗,胚培养获得 1 株杂种苗,这 4 株苗长势较弱,移栽至田间后死亡;而在子房结合胚培养条件下,经鉴定后存活下来的有 7 株杂种苗,其中仅有 3 株杂种苗生长势较好(2 株为绿叶,1 株为花叶),移栽至田间后能正常开花,后续试验中主要研究这 3 株杂种植株,将其编号为 F_1 -1、 F_1 -2、 F_1 -3。

2.2 流式细胞仪初步鉴定

杂种与亲本的流式细胞仪检测结果显示:母本油菜、父本甘蓝与 F_1 -1 单株的主峰值分别在 88、48 和 67 处,母本油菜与甘蓝除了主峰以外,都出现了 1 个小峰,位于 176 和 96 处,这是由于所选的材料较幼嫩,除了 G1 期的细胞外还有部分 G2 期的细胞^[12]。试验中 F_1 -1、 F_1 -2、 F_1 -3 对应的荧光值分别为 67、66、64。

2.3 染色体数目鉴定

杂种的染色体数目均为 28 条(图 1-A),而其母本油菜(AACC)为 38 条,父本甘蓝(CC)为 18 条,可

以看出杂种的染色体数目是父本和母本的中间值。

2.4 杂种的性状

1) 植株形态特征。母本油菜叶片(图 1-B1)长卵圆形,叶缘为钝齿状、绿色、浅裂,有 2 对以上叶耳,叶片相对较薄,株型开散(图 1-C);父本甘蓝叶片(图 1-B4)呈倒卵圆形,深绿色,叶缘稀疏锯齿状,无叶耳,叶面光滑无毛,叶片肥厚,有蜡粉,株型紧凑(图 1-E);杂种多为中间类型,叶片上部成卵圆形,下部为浅裂,叶缘为钝齿状,叶耳为 1~2 对,叶片厚度居中,植株相对紧凑(图 1-D),植株 F_1 -3 为花叶(图 1-B3),其他叶片颜色为深绿色(图 1-B2)。

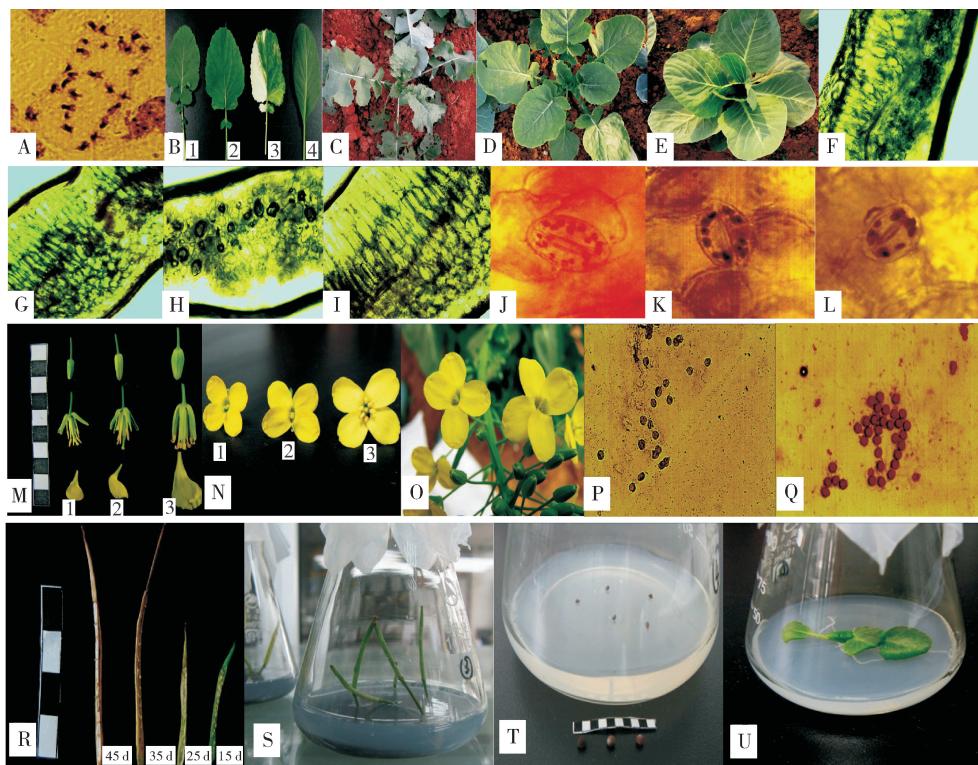
2) 器官形态特征。杂种的叶片结构、气孔保卫细胞叶绿体数以及花器官形态介于亲本之间。

① 叶片结构。母本油菜表皮细胞只有 1 层,为无色透明状;栅栏组织由 1~2 层浅绿色圆球形细胞过渡到 2~3 层绿色的长柱条形的细胞;海绵组织为 4~6 层深绿色的圆球形细胞(图 1-F)。父本甘蓝叶片较厚,表皮只有 1 层,为无色透明状;栅栏组织没有过渡细胞,为 4~5 层、排列规则的柱形细胞,绿色;海绵组织 5~6 层,绿色,细胞为圆形,排列规则(图 1-I)。 F_1 -1、 F_1 -2 的叶片厚度居中,栅栏组织无油菜的过渡细胞,海绵组织结构类似甘蓝(图 1-G); F_1 -3 花叶植株与亲本相比差异较大,栅栏组织缺失,内部为排列紧凑、部分不规则的圆形细胞,类似于海绵组织,颜色为浅绿色(图 1-H)。

② 叶片气孔保卫细胞叶绿体数量。母本油菜(图 1-J)的气孔保卫细胞叶绿体相对较小,平均叶绿体数约为 18,变幅为 15~20;父本甘蓝的气孔保卫细胞叶绿体较大(图 1-L),平均值约为 10,变幅为 7~13。而杂种的气孔保卫细胞叶绿体大小为亲本中间型,变幅为 11~15,叶绿体数量居于亲本之间(图 1-K)。

③ 花器官形态。杂种的花蕾与花瓣大小介于两亲本之间,柱头、花丝和花药大小与形态接近于母本油菜,花瓣形状接近于父本甘蓝,杂种花色比两亲本深,总体表现介于亲本之间(图 1-M2、N2)。杂种植株的首花期介于亲本之间,但花期持续天数比亲本都长,长达 89 d;从 2010 年 3 月 8 日一直持续到 5 月 26 日。

收获时对杂种的植株高度、根基部周长、次分枝数目、分枝部位等多种农艺性状进行调查,结果(表 1)表明:杂种植株较高,植株粗壮,分枝数变多,分枝部位居中,表现出较强的杂种优势。



A. 柱头染色体数目观察 Chromosome counting of stigma cell; B. 杂种叶片形态与亲本比较 Comparison of leaf morphology between hybrid plants and parents; C. 母本甘蓝型油菜 *B. napus*; D. 杂种植株 Hybrid plant; E. 父本甘蓝 *B. oleracea*; F. 甘蓝型油菜叶片结构 Leaf structure of *B. napus*; G. 绿叶杂种叶片结构 Leaf structure of the normal hybrid plant; H. 花叶杂种叶片结构 Leaf structure of mosaic hybrid plant; I. 甘蓝叶片结构 Leaf structure of *B. oleracea*; J. 油菜叶片气孔保卫细胞叶绿体观察 Observation of stomata guard cell chloroplasts of *B. napus*; K. 杂种植株气孔保卫细胞叶绿体观察 Observation of stomata guard cell chloroplasts of hybrid; L. 甘蓝叶片保卫细胞叶绿体观察 Observation of stomata guard cell chloroplasts of *B. oleracea*; M,N. 杂种与亲本的花器官比较(1. 母本油菜,2. 杂种植株,3. 父本甘蓝) Flower organ comparison between hybrid and parents (1. *B. napus*, 2. Hybrid plant, 3. *B. oleracea*); O. 杂种不育性表现稳定 Hybrid plant, sterility was stable; P. 杂种植株的花粉活力观察 Pollen viability of hybrid plants; Q. 父本花粉活力观察 Pollen viability of *B. oleracea*; R. 不同时间子房内败育情况 Embryo abortion in the ovary of different days; S. 回交子房培养 Ovary culture of backcross generation; T. 回交1代种子与甘蓝种子 Seeds comparison between backcross generation and *B. oleracea*; U. 回交1代植株 Backcross generation plants obtained.

图1 杂种与亲本的性状比较

Fig. 1 Different characteristics comparison between hybrid and parents

表1 甘蓝型油菜 *Eru CMS* 与甘蓝真杂种的农艺性状

Table 1 Agronomic traits of hybrids between *B. napus*

(*Eru CMS*) and *B. oleracea*

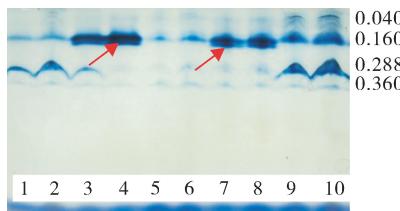
类别 Category	株高/cm Plant height	根基部 周长/cm Perimeter of basal part	一次分 枝数 No. of first branches	分枝 部位/cm Branching length of part	主花 序长/cm Length of inflorescence
母本 Female parent	171	6.1	22	27.2	44.1
正常杂种 Normal hybrid	192	8.2	29	21.4	52.9
花叶杂种 Mosaic hybrid	179	6.6	25	22.5	43.2
父本 Male parent	139	5.4	19	19.9	39.5

2.5 杂种的过氧化物同工酶分析

杂种与亲本过氧化物同工酶谱带分析结果(图2)表明:杂种植株中有双亲的各自特征酶带,位于迁移率0.040、0.160、0.288、0.360处,表达强弱不同;绿叶杂种(F₁-2)与亲本酶谱带大体一致,仅表达量较弱;而绿叶杂种(F₁-1)和花叶杂种(F₁-3)不仅具有亲本的谱带,也有自身的特征酶带,位于迁移率0.176处,叶片和花蕾中均有表达(红色箭头指示处)。

2.6 杂种的育性及与甘蓝的亲和性

1) 杂种的育性。花粉活力检测结果显示:杂种植株均表现为雄性不育,与母本油菜不育性状表现一致,花开放时雄蕊干瘪,无可见花粉,雌蕊正常



1、2:母本油菜 *B. napus*; 3、4: *F*₁-1; 5、6: *F*₁-2; 7、8: *F*₁-3;
9、10:甘蓝 *B. oleracea*.

图2 杂种与亲本的叶片和花蕾的过氧化物同工酶分析

Fig. 2 POD comparison between hybrid
plants and parents in leaf and buds

(图1-O)。杂种植株的花粉(图1-P)被染成浅褐色,表明花粉无活力;花期连续测定花粉活力,杂种植株田间的不育性都很稳定。而父本甘蓝的雄蕊布满花粉(图1-M3、N3),花粉均被染成红色(图1-Q),表明花粉具有活力。

2)杂种与甘蓝杂交亲和性。以杂种为母本,甘蓝为轮回亲本进行授粉回交,授粉后观察,授粉1周后子房生长较快,至12 d时生长逐渐变缓;12 d时选取一定数量子房,按前期最优方法稍加改良后进行胚抢救,田间留有子房继续生长、观察;取授粉后田间生长15、25、35、45 d的子房进行观察,子房虽然留存在植株上,但生长很缓慢,从授粉后15 d后开始逐渐败育,生长35~45 d的子房剖开后,依旧没有获得种子(图1-R);经抢救获得一些种子,但与正常甘蓝种子相比较为干瘪、瘦小(图1-S、T),后期获得一些回交1代的植株(图1-U)。

3 讨 论

甘蓝型油菜与甘蓝种间存在较大的杂交障碍,人工蕾期授粉经胚抢救后仅获得少量的种子,成苗率也较低,经检测仅获得11株杂种植株,这与前人利用普通甘蓝型油菜与羽衣甘蓝远缘杂交经抢救仅获得3粒发芽的种子及花椰菜远缘杂交获得11粒发芽的种子结果一致^[8-9]。杂种与甘蓝回交时,回交1代胚败育的时间比杂种提前,自然条件下仍不能获得种子,主要是由于杂种(ACC)为三倍体,与轮回亲本甘蓝(CC)二倍体回交时联会紊乱,染色体不平衡,因此也很难获得回交1代。前人研究表明AC基因组存在一定的同源性,同时以染色体数目多的为母本进行远缘杂交容易获得成功^[14-15],这可能是经胚抢救能获得少量的杂种和回交1代的主要原因。目前为了提高获得杂种1代及回交世代的工作效率,同时为了增加其实用性,期望通过先将甘蓝

加倍后获得同源四倍体甘蓝(CCCC=36),再与甘蓝型油菜(AACC=38)杂交及回交的方法克服上述缺点,相关试验正在进行中。笔者所在课题组研究中也发现甘蓝型油菜(Eru CMS)与甘蓝(CC)杂交回交都很困难,而其与红菜薹(AA)在自然条件下却能够获得大量的杂种1代及回交世代,具体原因有待进一步研究。

对能够正常生长的杂种采用多种方法鉴定,试验中得到的3株杂种(原始组培苗)的染色体数目都是28条,是两亲本的平均值,与前期流式细胞仪测定杂种DNA含量介于两亲本之间的结果是一致的;3株杂种植株的对应的荧光值为67、66、64,3个植株不同的DNA含量,一方面反映杂种植株中双亲遗传物质构成的多样性,另一方面也为种间杂种的获得提供了佐证。杂种鉴定有细胞学、形态学、分子标记等多种方法鉴定,试验中前期采用染色体计数结合流式细胞仪鉴定,相对准确;后期杂种田间表现完全不育,和母本油菜一致,也佐证鉴定方法的准确性。

对杂种的性状研究结果表明:绿叶杂种的大部分性状介于两亲本之间,如幼苗形态、叶片结构、花器官等,与前人研究远缘杂种的结果有类似之处^[16-18];花叶杂种虽然叶片结构出现了变异,和两亲本差异较大,过氧化物酶同工酶也出现新的特异酶带,但其流式细胞仪测定值接近两亲本中间值,染色体数目也为28条,其他特性均介于亲本之间,可能其遗传物质没有改变,是组培过程等环境因素使其产生了一些变异;杂种的部分农艺性状表现出超亲本的杂种优势,具有加性遗传效应:父本甘蓝田间具有天然的抗虫性,母本油菜生长势较旺,因而杂种植株生长势良好,田间基本没有病虫害;杂种田间不育性彻底,不育度为100%,显示了细胞质母性遗传规律,连续多次测定杂种花粉育性均无活力,表明甘蓝型油菜的不育基因已成功转入到杂种中,同时杂种植株苗期遇低温不黄化,花期遇连续低温,无活力花粉出现,表明杂种的不育性稳定。

本试验通过对甘蓝型油菜Eru CMS与甘蓝种间杂种的鉴定和性状调查,获得3株生长势强、能正常生长开花、不育性稳定的杂种材料,并且得到了回交1代植株,以后将对回交1代的特性和不育性进行进一步的观察和研究;以回交世代为中间材料,继续与甘蓝进行回交,期望获得含甘蓝型油菜不育基因的甘蓝雄性不育新种质资源。

参 考 文 献

- [1] 方智远,刘玉梅,杨丽梅,等.我国甘蓝遗传育种研究概况[J].园艺学报,2002,29(增刊):657-663.
- [2] 康俊根,王晓武,张国裕,等.利用cDNA-AFLP检测甘蓝雄性不育相关基因的时序性表达[J].园艺学报,2006,33(3):544-548.
- [3] 严慧玲,方智远,刘玉梅,等.甘蓝显性雄性不育材料DGMS79-399-3不育性的遗传效应分析[J].园艺学报,2007,34(1):93-98.
- [4] 马超,张恩慧,吴康云.甘蓝转育异源胞质雄性不育基因(PoLC-MS)的同工酶分析[J].中国农学通报,2008,24(6):32-36.
- [5] 康俊根,张国裕,张延国.四种甘蓝雄性不育类型差异基因表达分析[J].农业生物技术学报,2006,14(4):551-554.
- [6] ALIYA M, MASAHIRO K, FUMIKA K. Production of intergeneric hybrids between *Brassica* and *Sinapis* species by means of embryo rescue techniques[J]. *Euphytica*, 1998, 103: 123-130.
- [7] ZHANG G Q, SONG W J, ZHOU W J, et al. Resynthesizing *Brassica napus* from interspecific hybridization between *Brassica rapa* and *B. oleracea* through ovary culture[J]. *Euphytica*, 2004, 140: 181-187.
- [8] 陈树忠,殷家明,唐章林,等.甘蓝型油菜与羽衣甘蓝远缘杂交初步研究[J].西南农业大学学报,2000,22(3):208-210.
- [9] 张小玲,刘庆,唐征,等.甘蓝型油菜与花椰菜种间杂种子房离体培养研究初报[J].园艺园林科学,2006,22(5):316-318.
- [10] 何丹,徐跃进,万正杰,等.授粉时间及角果长度对红菜薹与甘蓝型油菜杂交后代荚粒数的影响[J].华中农业大学学报,2009,28(2):218-221.
- [11] 谭远宝,徐跃进,张艳,等.红菜薹和甘蓝型油菜远缘杂交后代的植物学和细胞学分析[C]//中国园艺学会十字花科分会.中国十字花科蔬菜研究进展论文集.北京:中国农业科学技术出版社,2009:210-214.
- [12] 吴红美,徐跃进,万正杰.甘蓝型油菜和抗虫甘蓝远缘杂种的获得和鉴定[C]//中国园艺学会十字花科分会.中国十字花科蔬菜研究进展论文集.北京:中国农业科学技术出版社,2009:203-209.
- [13] 袁素霞,刘玉梅,方智远,等.甘蓝类蔬菜小孢子再生植株染色体倍性与气孔保卫细胞叶绿体数的相关性[J].中国农业科学,2009,42(1):189-197.
- [14] CHOUDHARY B R, JOSHI P, RAMARAO S. Interspecific hybridization between *Brassica carinata* and *Brassica rapa* [J]. *Plant Breed*, 2000, 119: 417-420.
- [15] NISHIYAMA I, SARASHIMA M, MATSUZAWA Y. Critical discussion of abortive interspecific crosses in *Brassica* [J]. *Plant Breed*, 1991, 107: 288-302.
- [16] 周清元,李加纳,崔翠,等.芥菜型油菜×羽衣甘蓝种间杂种的获得及其性状表现[J].作物学报,2005,31(8):1058-1063.
- [17] 张丽,赵宏,陈斌,等.花椰菜与黑芥种间体细胞杂种的获得和鉴定[J].植物学通报,2008,25(2):176-184.
- [18] 姚星伟,刘凡,元兴福,等.非对称体细胞融合获得花椰菜与 *Brassica spinescens* 的种间杂种[J].园艺学报,2005,32(6):1039-1044.

Identification and characterization of interspecific hybrids from *Brassica napus* (Eru CMS) × *Brassica oleracea*

WU Hong-mei XU Yue-jin WAN Zheng-jie

College of Horticulture and Forestry/National Center for Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Hybrids from *Brassica napus* × *Brassica oleracea* were obtained by embryo rescue techniques, which is an effective approach for increasing the resources of male sterility of *Brassica oleracea*. Both the DNA content and chromosome number of hybrids were the mid-parent values. Characteristics of the hybrid were investigated. The results showed that hybrids were morphologically similar to parents during the growing periods, while inclined to the female parent during flowering. But hybrids had strong heterosis of growth. The leaf structure, chloroplast number in stomata guard cell, the floral organ, and the early flowering periods of hybrids were mid-parent, except the mutated leaf structure of mosaic hybrid. Hybrids had their own unique peroxidase isozymes bands. Test of the pollen viability showed that hybrids bore only non-viability pollens with 100% sterility. Backcross generation could be obtained only through embryo rescue techniques to overcome barriers of hybridization.

Key words *Brassica napus*; *Brassica oleracea*; interspecific hybrid; identification of hybrid; characteristic of hybrid

(责任编辑:张志钰)