中国油料作物学报 2016,38(3):281 - 286
Chinese Journal of Oil Crop Sciences doi:10.7505/j.issn.1007 - 9084.2016.03.002

甘蓝型油菜—菘蓝二体附加系的创制和细胞学分析

杨 汉,康 雷,李鹏飞,葛贤宏,李再云*
(作物遗传改良国家重点实验室,华中农业大学植物科学技术学院,湖北 武汉,430070)

摘要:为创制稳定遗传的甘蓝型油菜—菘蓝二体附加系,以花粉育性很低、在甘蓝型油菜品种华双3号(2n=38,AACC)上附加一条菘蓝(2n=14,II)特定染色体(g)的单体附加系(2n=39,AACC+1I_g)为父本,与正常的华双3号杂交,产生正常油菜胞质的单体附加系、经自交获得二体附加系(2n=40,AACC+1II_g)。该二体附加系的细胞学及基因组原位杂交观察表明,花粉母细胞减数分裂中染色体配对与分离基本正常,在终变期形成20个二价体,后期I进行20∶20的均等分离;第二次分裂中形成正常的四分体及四个子细胞,花粉的育性较高,自交结实好,产生的后代均携带菘蓝染色体。但也在少部分的花粉母细胞内出现菘蓝或油菜的落后染色体。该细胞学行为较稳定、育性较高的甘蓝型油菜—菘蓝二体附加系为菘蓝遗传研究及油菜育种研究提供了新材料。

关键词:甘蓝型油菜;菘蓝;附加系;减数分裂;基因组原位杂交
中图分类号:S565.4 **文献标识码**:A **文章编号**:1007-9084(2016)03-0281-06

Development and cytology of disomic alien addition between *Brassica napus* and *Isatis indigotiga*

YANG Han, KANG Lei, LI Peng-fei, GE Xian-hong, LI Zai-yun*
(*National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement*, *College of Plant Science and Technology*, *Huazhong Agricultural University*, *Wuhan* 430070, *China*)

Abstract: To develop cytologically stable disomic alien additions between *Brassica napus* (Huashuang 3) (2n=38, AACC) and *Isatis indigotiga* (2n=14, II), the cultivar Huashuang 3 was pollinated by one such monosomic addition carrying one specific chromosome of *I. indigotiga* but with very low pollen fertility caused by male sterile cytoplasm. The disomic addition (2n=40, AACC+1II_g) with normal cytoplasm of *B. napus* was obtained by crossing Huashuang 3 with this alien chromosome. The cytological and genomic *in situ* hybridization (GISH) analyses for this addition showed the main normal chromosome pairing (20 bivalents) and segregation (20∶20) during meiotic divisions of pollen mother cells, resulting in the high pollen fertility, seed-set and the progenies with alien chromosomes. But lagging chromosomes also occurred at low frequency during meiosis. This relatively stable disomic addition provided novel material for genetic study of this medicinal plant as well as for Brassica breeding.

Key words: *Brassica napus*; *Isatis indigotiga*; Alien addition; Meiosis; Genomic *in situ* hybridization (GISH)

远缘杂交是作物遗传改良的重要途径,广泛地用于将近缘种的有利性状和基因引入作物,或创建供遗传分析的材料(如异源染色体附加系、代换系和易位系)[1~4]。特别是通过培育异源染色体的单体和二体附加系,可将一个物种染色体组中的每一条染色体分割开来,用于研究其染色体组的结构和进化、鉴别基因连锁群、定位特定性状到特定染色体上、在近缘物种间比较基因同线性等[5]。附加系在芸薹属染色体组的结构和性状转移方面取得较大进展[6],但培育出属间全套附加系的报道不多[7]。

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort., 2n=14, II)为十字花科(现称芸薹科,Brassicaceae)菘蓝族(Isatideae)菘蓝属植物,其根称板蓝根,其叶称大青叶,具有清热解毒、凉血消肿的功效,且菘蓝含有杀虫、抗病的功效,是油菜遗传改良的重要资源[8,9]。虽然板蓝根是我国常用的大宗药材,但对其遗传研究的报道

收稿日期:2015-12-31
基金项目:国家自然科学基金(31571703)
作者简介:杨 汉(1991-),女,硕士研究生,从事油菜细胞遗传学研究,E-mail:928775703@qq.com
*通讯作者:李再云(1962-),男,教授,主要从事油菜远缘杂交及细胞遗传学研究,E-mail:lizaiyun@mail.hazu.edu.cn

较少。现未见有关菘蓝基因组大小的报道。同属的欧洲菘蓝(*Isatis tinctoria* L., 2n = 28)为四倍体,其1C DNA 为0.58pg[10],与栽培芸薹属二倍体种(约600Mb)的相当;故我国菘蓝的基因组较小(估计约300Mb),其染色体的体积比芸薹属的还小,这一特征在油菜与菘蓝的体细胞杂种及附加系中得到明显的体现[11,12]。本实验室通过原生质体融合获得甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.,2n = 38)与菘蓝的体细胞杂种(2n = 52,AACCII)[11],与甘蓝型油菜连续回交,结合形态、细胞学和 SSR 标记鉴定出全套的、附加 7 条不同菘蓝染色体的单体附加系(monosomic alien addition lines, MAAL, 编号为 Ma, Mb, Mc, ……,Mg)[12]。所用的 100 多个 SSR 标记为中国中医科学院黄璐琦实验室根据菘蓝基因组 DNA 序列开发。其中附加系 Me 表现菘蓝的褐色花药特性,Mf 和 Mg 附加的染色体分别携带 5S rDNA 和 45S rDNA 位点,其余 4 个 MAAL 利用 SSR 标记区分。特别的是,附加菘蓝 d 染色体的二体附加系叶提取物具有一定的抗流感病毒活性,表明这条菘蓝染色体上携带有控制合成特定抗病毒活性成分的主要基因;此材料已申请北京市非审定农作物品种鉴定,命名为蓝菜 1 号(京品鉴菜 2014032)。但由于双亲的线粒体重组而使附加系的花药发育异常,除附加系 Me 的花药发育正常外,其余六个均因雄蕊心皮化发育与异常而表现雄性不育,给它们的繁育及研究带来困难。

为了消除不育胞质对附加系繁殖与保存的限制与影响、创制遗传相对稳定的甘蓝型油菜—菘蓝二体附加系,本研究以在低温条件下可产生少量花粉、在甘蓝型油菜品种华双 3 号上附加一条菘蓝特定染色体(g)的单体附加系(2n = 39, AACC + $1I_g$)为父本与正常的华双 3 号杂交,产生正常油菜胞质的单体附加系后自交获得二体附加系(2n = 40, AACC + $1II_g$)。对该二体附加系进行了普通细胞学及基因组原位杂交研究,显示其花粉母细胞减数分裂中染色体配对与分离基本正常,花粉育性较高、自交结实好,为菘蓝的基因组结构研究及油菜育种提供新材料。

1 材料与方法

1.1 材料

以甘蓝型油菜(*Brassica napus*,2n = 38,AACC)品种华双 3 号与菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.,2n = 14,II)的 g 单体附加系[13]为父本,华双 3 号为母本,在杂交产生的后代中鉴定出附加菘蓝染色体 g 的单体附加系,将其自交后在后代中鉴定出 g 二体附加系,并观察形态及结实率。

1.2 分子标记

用 CTAB 法提取材料基因组 DNA。

用菘蓝着丝粒引物 CEN1R(5′ - 3′: AGAGCACTTTAATGTGTACCT)、CEN1F(5′ - 3′: CATGCTTCGCGTTCTATCTTT)进行扩增,扩增程序为:94℃ 5min,35 个循环(94℃ 30s,54℃ 30s,72℃ 45s),72℃延伸 10min。

用菘蓝 g 染色体特异引物进行 SSR 检测,扩增程序为:94℃ 5min;94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 45s,10 个循环(每个循环退火温度降 0.7℃);94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 45s,30 个循环;最后 72℃延伸 10min。

1.3 细胞学及花粉育性观察

开花初期,取花蕾用卡诺固定液(乙醇: 冰醋酸 =3: 1)固定,并更换新鲜固定液几次,直至花蕾颜色泛白,然后 4℃保存。镜检时取合适大小的花蕾,剥取其中一个花药,在 1mol/L 的 HCl 中 60℃解离 2min,用蒸溜水洗去盐酸后制片,再用改良的卡宝品红染色压片,显微镜检查花粉母细胞减数分裂时期;对确定为终变期和后期 I 的花蕾保存,用于原位杂交分析。

在晴天取当天开放的花,将花药置于玻片上,于 1% 醋酸洋红液中挤出花粉使其染色,去掉花药后盖片,普通光学显微镜下观察计数(统计 300 ~ 500 个花粉粒),大而圆的为可育花粉,小而瘪的为不育花粉,并计算花粉的可染率(%),即可育花粉数占观察总花粉个数的百分比。

1.4 原位杂交

基因组原位杂交程序按已有的方法进行[14,15]。

用切口平移法标记菘蓝的基因组 DNA 探针,反应体系为: 10 × buffer 5μL、dNTP 5μL、DNase Ⅰ(0.005U)2μL、DNA polyI 1.2μL、Bio - 11 - dUTP 1.2μL、DNA(100ng/μL)5μL、ddH_2O 30.6μL。

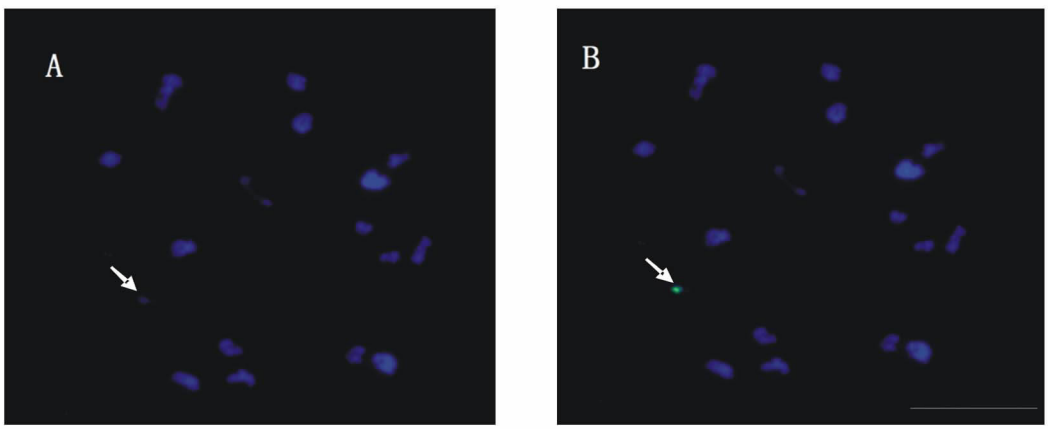
制备好的染色体制片在烘箱中过夜,5ng · μL^{-1}的胃蛋白酶处理(37℃,20min),100ng · μL^{-1}的 RNase 酶解(37℃,1h),4% 多聚甲醛处理 10min,各个制片在 2 × SSC 中摇洗 3 次,每次 5min,然后进行梯度脱水(75% 乙醇 3min、100% 乙醇 3min),干燥 1h 以上。配好的杂交液(每片 50μL:50% 去离子甲酰胺 25μL、20 × SSC 5μL、鲑鱼精 DNA 0.5μL、10 × SDS 2.5μL、50% 硫酸葡聚糖 10μL、菘蓝基因组 DNA 探针 3μL、油菜封阻 DNA 4μL),85℃变性 10min,冰上冷却 5min。盖膜,原位 PCR 仪 74℃共变

性7min,37℃湿盒温育过夜。20% 甲酰胺(42℃,10min),2 × SSC(42℃,2 × 5min),2 × SSC(室温,5min),每片加 5% BSA 100μL/片,盖膜室温放置5min。避光:5% BSA 稀释 Cy3 100 倍,50μL/片,盖膜,37℃温育 1h,1 × PBS 中摇 5min,每片滴加 4μg · mL^{-1}DAPI 100μL,盖膜,室温 30min,1 × PBS 中揭膜,每片加抗荧光猝灭剂一滴,用干净的盖片盖好,4℃避光保存,荧光显微镜下观察。

2　结果与分析

2.1　甘蓝型油菜 – 菘蓝二体附加系的培育

以前的研究表明,甘蓝型油菜—菘蓝单体附加系(除 Me 外)的花药发育异常,四强雄蕊发生心皮化,两个短雄蕊只有花丝没有花药,其原因为在体细胞融合中发生了双亲的线粒体重组;但部分附加系在开花早期有微粉,可产生少量可育花粉[6]。故可用附加系的花粉给正常甘蓝型油菜授粉,将附加的菘蓝染色体转移到具有正常细胞质的甘蓝型油菜上,创制育性提高的二体附加系。用 g 附加系的花粉给华双 3 号授粉后,在后代中经 GISH 分析证实鉴定出 2n = 38、39 的后代,其中,2n = 39 的植株为单体附加系,包含有一条菘蓝染色体(图 1)。它们在植株形态上与华双 3 号非常相似,因 g 单体附加系也与华双 3 号没有明显的形态差异,这两类后代植株的花发育正常、花粉育性高,2n = 38 的为 94.46%,2n = 39 的为 65.25%。这也证明单体附加系的异常花药由细胞质基因引起。将 2n = 39 的植株进行自交,在后代中鉴定出 2n = 40 的二体附加系,其结实率表现较好。



注:DAPI 染色。绿色为杂交探针信号。A:终变期染色体;B:终变期杂交信号图。箭头所指为菘蓝染色体。标尺 10μm
Note: DAPI staining images at diakinesis stage. A: Chromosome; B: Hybridization (green color shows probe signal). Arrows indicate *I. indigotiga* chromosome. Bar: 10μm

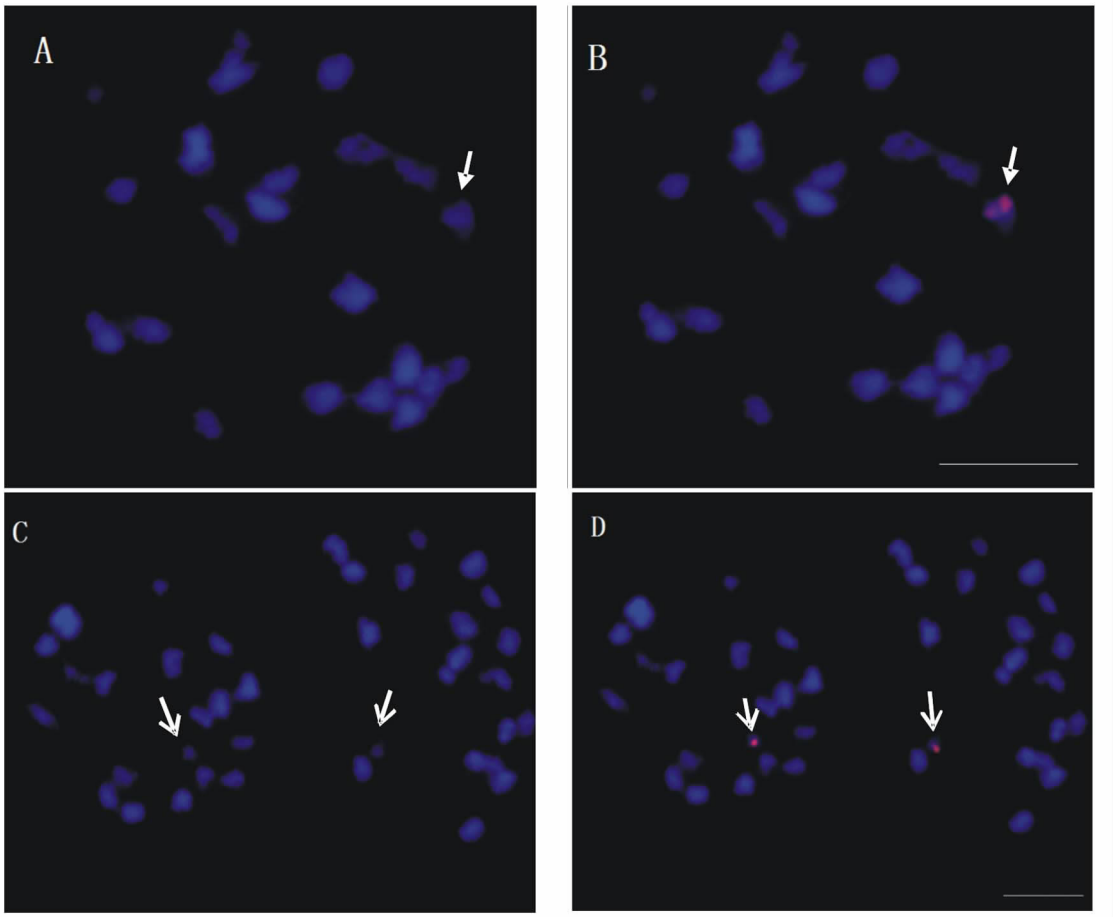
图 1　甘蓝型油菜 – 菘蓝单体附加系花粉母细胞减数分裂的 GISH 分析

Fig. 1　GISH of meiotic pairing and segregation in PMCs of monosomic addition

2.2　甘蓝型油菜 – 菘蓝二体附加系的细胞学观察

为鉴定出二体附加系,以菘蓝的基因组 DNA 为探针,经生物素标记后并以甘蓝型油菜华双 3 号的基因组 DNA 为封阻,对从上面自交后代植株中挑选出的终变期、中期 I 和后期 I 花粉母细胞(PMCs)进行基因组荧光原位杂交(GISH)分析。在目标植株三个时期的 PMC 细胞中均有两个明显的杂交信号,标记的两条菘蓝染色体在终变期及中期 I 形成一个二价体(图 2A,B),在后期 I 被分配至细胞两极,染色体表现均等的 20∶20 分离(图 2C,D);与油菜的染色体相比,菘蓝的染色体具有较小的体积。表明附加的两条菘蓝染色体与其他油菜染色体一样进行正常的配对与分离,为其较稳定的传递提供了细胞学基础。

对二体附加系植株的花粉母细胞减数分裂过程进行了观察(图 3)。在终变期,染色体主要配对成 20 个二价体(图 3A),也出现少量的三价体或四价体。在中期 I 时,多数细胞(76%)中二价体整齐排列于赤道板上(图 3B),少数细胞(24%)有 1 ~ 2 条染色体游离在赤道板外,也有可能是附加的二价体提前分离(图 3C)。后期 I 以 20∶20 的均等分离为主(图 3D),少量 19∶21 的分离。后期 I 及末期 I 时少数细胞(4%)中出现一条落后染色体(图 3E,F)。第二次减数分裂时(图 3G),多数细胞正常分裂,产生 4 个子细胞及四分体。少数中期 II 细胞(5%)有 1 条染色体游离在赤道板外(图 3H),未发现有 2 条游离的情况,后期 II 及末期 II 没有落后染色体出现(图 3I)。故二体附加系的减数分裂过程基本正常。



注:DAPI 染色。红色为杂交探针信号。A:终变期染色体;B:终变期杂交信号图;
C:后期Ⅰ染色体。D:后期Ⅰ杂交信号图。箭头所指为菘蓝染色体。标尺 10μm
Note:The blue color is from DAPI staining, and the red is from hybridization signal. A:Chromosomes at diakinesis stage;
B:Hybridization (red color shows probe signal) signal at diakinesis stage; C:Chromosomes at anaphase Ⅰ stage;
D:Hybridization (red color shows probe signal) signal at anaphase Ⅰ stage. Arrows indicate *I. indigotiga* chromosome. Bar:10μm

图 2 甘蓝型油菜 – 菘蓝二体附加系花粉母细胞减数分裂的 GISH 分析

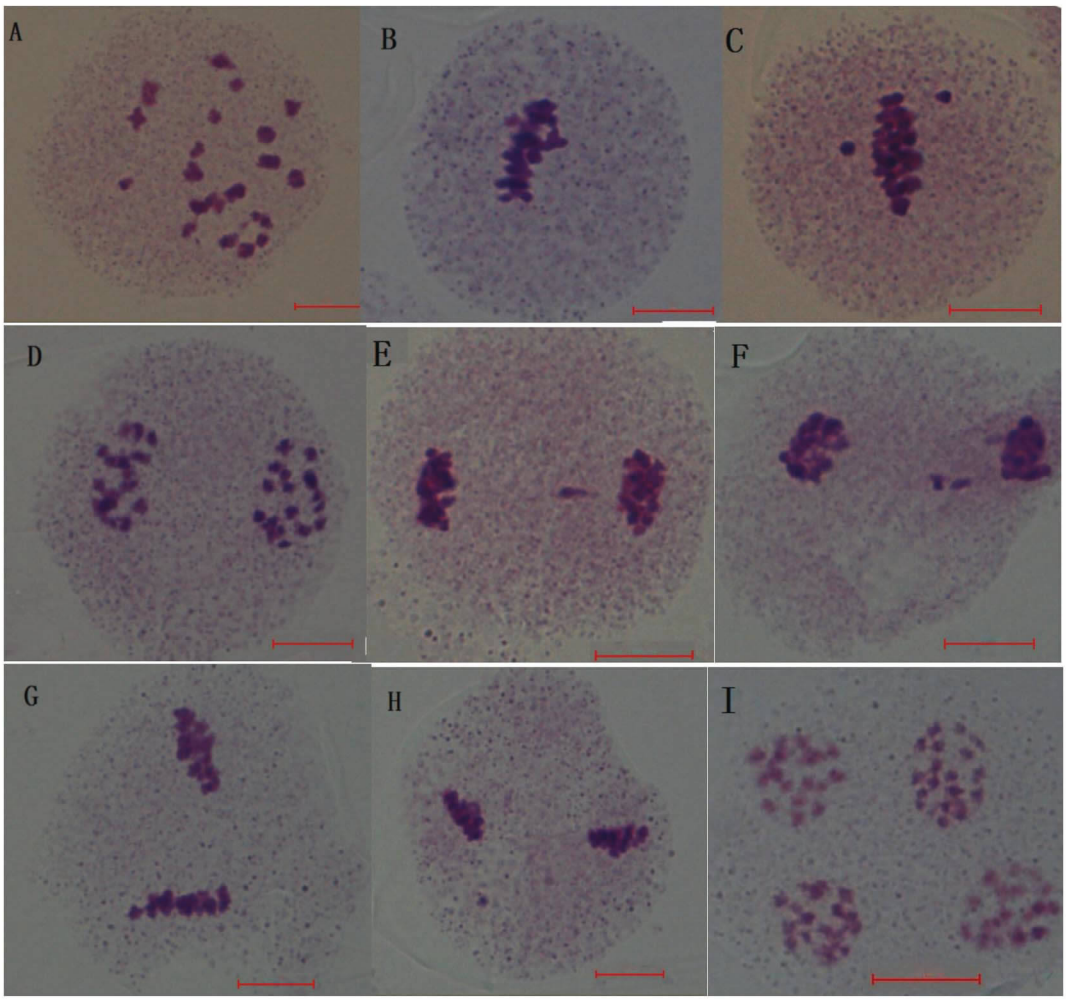
Fig. 2 GISH of meiotic pairing and segregation in PMCs of disomic addition

2.3 甘蓝型油菜 – 菘蓝二体附加系中菘蓝染色体的传递率

提取 34 株二体自交后代的叶片 DNA,进行菘蓝着丝粒特异引物的扩增,检测结果表明所有植株均有菘蓝着丝粒片段。为了进一步验证该菘蓝染色体的存在,进行 g 染色体特异 SSR 引物 164 的扩增,也显示均有菘蓝特异片段(图 4)。可见所有该二体附加系的自交后代均有菘蓝染色体。

3 讨论

由于甘蓝型油菜与菘蓝在分类上属于芸薹科的两个族(tribe),有性杂交未能获得预期杂种[16],后来通过体细胞融合产生了预期的异源六倍体(AACCII)[11],经过多年的回交与选择才建立了全套的附加系[12,13],是研究菘蓝的基因组结构及解析药用成分、向油菜转移目标性状及基因的重要材料。在回交过程中以正常的甘蓝型油菜为父本,故所有回交后代(附加系及甘蓝型油菜类型后代)均保留了体细胞融合产生的异源六倍体的细胞质。叶绿体 DNA 分析显示,异源六倍体及附加系的叶绿体组成与甘蓝型油菜的相同[11,12];而双亲的线粒体 DNA 发生了多次重组,且以菘蓝的成分为主(康雷等,未发表)。也许正是由于线粒体重组,导致六个(除附加系 Me 外)及甘蓝型油菜类型后代的雄蕊心皮化发育,造成附加系繁殖与保存的困难。本研究结果表明,将附加系的细胞质转换成正常甘蓝型油菜后,花器官发育正常,花粉育性得到很大提高,自交结实率也较高,为其遗传研究及育种应用提供了很大的便利。



注:A:终变期;B,C:中期 I;D:后期 I;E,F:末期 I;G,H:中期 II;I:后期 II。标尺:10μm

Note:A:diakinesis; B,C:Meiosis metaphase I; D:Anaphase I; E,F:Telophase I; G,H:Meiosis metaphase Ⅱ; I:Anaphase Ⅱ; Bar:10μm

图 3　甘蓝型油菜 - 菘蓝二体附加系的减数分裂观察

Fig. 3　Meiotic divisions of PMCs of disomic addition

注:H3:甘蓝型油菜华双 3 号;II:菘蓝;1 ~ 34:二体自交后代

Note:H3:II:*I. indigotica*; 1 - 34:Selfing progeny of disomic alien addition line

图 4　二体附加系后代的菘蓝染色体特异 SSR 分析

Fig. 4　SSR amplification specific for one chromosome of *I. indigotica*

单体附加系 g 中附加的这条菘蓝染色体多以单价体的形式存在,但也可与甘蓝型油菜染色体发生部分同源配对,并且甘蓝型油菜染色体的配对受到影响,多价体频率增加[13];在后期 I 菘蓝染色体进入一个子细胞,而油菜染色体多以均等的 19: 19 分离、少数以非均等的 18: 20 分离;故这条外源染色体在一定程度上干扰了油菜染色体的正常减数分裂。而本研究中获得的具有甘蓝型油菜正常细胞质的二体附加系中,附加的两条菘蓝染色体与油菜染色体一起,在花粉母细胞减数分裂过程中主要表现正常的配对与分离(图 2,3),为其较高的花粉育性及结实率提供了细胞学基础;但同时也发生较低频率的落后染色体,特别是油菜与菘蓝的染色体均有异常;今后可增加自交代数以进一步稳定附加系的细胞学行为及提高育性。开发的菘蓝着丝粒特异引物,可用于快速的检测附加系后代中菘蓝染色体的存在,但菘蓝染色体的拷贝数有赖于直观的 FISH 技术。

参考文献:

[1] 戴华军,朱正斌,沈雪林,等. 作物远缘杂交育种的途径及其实质[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(1):144-149.

[2] 刘 炜,申书兴,王彦华,等. 大白菜-甘蓝异附加系的获得与鉴定[J]. 园艺学报,2008,35(2):207-212.

[3] 吕文欣,王彦华,赵建军,等. 大白菜-结球甘蓝1号染色体二体异附加系的获得与鉴定[J]. 园艺学报,2011,38(7):1 275-1 282.

[4] 葛荣朝,张敬原,赵宝存,等. 一个耐盐小麦-多枝赖草二体异附加系外源染色体的鉴定[J]. 中国农业科学,2006,39(1):193-198.

[5] Chang S B, de Jong H. Production of alien chromosome additions and their utility in plant genetics[J]. Cytogenet Genome Res,2005,109:335-343.

[6] Prakash S, Bhat S R, Quiros C F, et al. Brassica and its close allies: cytogenetics and evolution[J]. Plant Breed Rev,2009,31:21-187.

[7] Budahn H, Schrader O, Peterka H. Development of a complete set of disomic rape-radish chromosome-addition lines[J]. Euphytica,2008,162:117-128.

[8] 李楚源,曾令杰. 板蓝根研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2005,19(3):51-55.

[9] 李勇超,任永信,陈宏恩. 栽培菘蓝居群的遗传多样性分析[J]. 湖北农业科学,2013,52(8):1 842-1 847.

[10] Al-Shehbaz I A, Beilstein M A, Kellogg E A. Systematics and phylogeny of the *Brassicaceae* (Cruciferae): an overview[J]. Plant Systematics Evoutionl,2006,259:89-120.

[11] Du X Z, Ge X H, Yao X C, et al. Production and cytogenetic characterization of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Isatis indigotica*[J]. Plant Cell Rep,2009,28:1 105-1 103.

[12] Kang L, Du X Z, Zhou Y Y, et al. Development of a complete set of monosomic alien addition lines between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* (Chinese woad)[J]. Plant Cell Rep,2014,33:1 355-1 364.

[13] 康 雷. 全套甘蓝型油菜-菘蓝单体附加系及新型CMS的创建[D]. 武汉:华中农业大学,2014.

[14] 葛贤宏. 人工合成芸薹属异源六倍体与诸葛菜属间杂种的细胞学及分子生物学研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.

[15] Wang Y P, Zhao X X, Sonntag K, et al. Behaviour of *Sinapis alba* chromosomes in a *Brassica napus* background revealed by genomic *in-situ* hybridization[J]. Chromosome Res,2005,13:819-826.

[16] Tu Y Q, Sun J, Ge X H, et al. Production and genetic analysis of partial hybrids from intertribal sexual crosses between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* and progenies[J]. Genome,2010,53:146-156.

(责任编辑:郭学兰)