

萝卜-芥蓝杂种 F_1 代创制及杂种鉴定

魏丽华¹, 李象松¹, 李炫丽¹, 汪艳杰¹, 王冰¹, 吴江生², 龙鸿^{1*}

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 以萝卜为母本, 以芥蓝为父本, 采用人工去雄授粉的方法进行杂交, 然后通过胚抢救 (embryo rescue) 得到 F_1 代植株, 并利用 RAPD 技术对杂种 F_1 代幼苗进行了鉴定。RAPD 鉴定结果表明: 杂种表现出亲本的特异带或者亲本不具备的新谱带, 有的还遗失了亲本的特异带或者共有带。

关键词: 远缘杂交; 胚抢救; RAPD

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2010)02-0243-03

Obtaining F_1 Hybrid and Hybrid Identification between *Raphanus sativus* L. and *Brassica alboglabra* Bailey

WEI Li-Hua¹, LI Xiang-Song¹, LI Xuan-Li¹, WANG Yan-Jie¹, WANG Bing¹, WU Jiang-Sheng², LONG Hong^{1*}

(1. College of Life Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Using hand cross and embryo rescue, F_1 plants from intergeneric *Raphanus sativus* L. ($2n=18, RR$) and *Brassica alboglabra* Bailey ($2n=18, CC$) hybrids were obtained. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to identify the F_1 plants. The RAPD results indicated that the hybrids produced specific bands of parents or new bands absent in both parents. The F_1 plants also lost some specific bands or common bands of both parents.

Key words: Distant hybridization; Embryo rescue; RAPD

远缘杂交是指不同种或亚种间以及种以上亲缘关系更远的个体之间的杂交, 包括有性杂交和体细胞杂交。远缘杂交是植物遗传研究和遗传改良的重要技术之一, 被用来研究物种间的亲缘关系, 创建供遗传分析的材料 (如异源染色体附加系、代换系和异位系等), 转移有利性状和基因等。许多研究者进行了甘蓝与萝卜属植物间的远缘杂交研究, 并采用离体组织培养、体细胞融合等技术来克服属间杂交不亲和性^[1]。组织培养是用来获得杂交后代的常规方法。目前应用最成功的就是胚抢救, 即利用离体组织培养来挽救胚胎发育中后期的即将败育或不成熟的种间杂种胚。胚抢救包括胚珠培养、子房培养和胚培养。

目前鉴定杂种的主要技术有: 形态学鉴定、细胞学鉴定、同工酶谱鉴定、分子标记鉴定。形态学和细

胞学鉴定具有简单易行, 直接明了等特点, 同工酶鉴定易受到环境和发育阶段的影响^[2]。利用 RAPD 分子标记技术对杂种真实性进行快速鉴定, 能对早期幼苗进行鉴定, 是一种行之有效的杂种鉴定方法^[3,4]。

本研究以萝卜为母本, 以芥蓝为父本, 采用人工去雄授粉的方法进行杂交。然后分别取杂交后 5、9、13 d 的子房, 进行胚抢救 (embryo rescue) 后得到 F_1 代植株, 利用 RAPD 技术鉴定杂交苗。远缘杂交 F_1 代的创制也将为后期进一步通过基因组加倍而产生异源多倍体作为育种桥梁植物, 以及研究异源多倍体进化过程中的遗传特点提供有价值的材料。

1 材料与方法

1.1 材料

萝卜何庆品种 (*Raphanus sativus* L. cv. Heqing,

收稿日期: 2009-03-24, 修回日期: 2009-05-08。

基金项目: 教育部留学回国人员基金项目 (4002-082017)。

作者简介: 魏丽华 (1982 -), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: longhong@mail.hzau.edu.cn)。

2n=18,RR) 和芥蓝 (*Brassica alboglabra* Bailey, 2n=18,CC) 种子由华中农业大学国家油菜工程技术研究中心提供和保存。

1.2 田间杂交

萝卜和芥蓝种子在播种季节种植于华中农业大学国家油菜工程技术研究中心试验田,常规田间管理,待花期时,以芥蓝为父本,以萝卜为母本,采用人工去雄授粉的方法进行杂交。开花前一天对母本进行剥蕾、去雄后套袋,父本套袋。开花后授粉套袋,并挂牌标记杂交组合、授粉时间。

1.3 胚抢救

分别切取杂交后 5、9、13 d 的子房,先用 75% 的乙醇表面灭菌 0.5 min,再用 0.1% 升汞浸泡 12 min,无菌水冲洗 3 次。然后接种在 MS + 0.2 mg/L 6-BA (6-苄基氨基嘌呤) 培养基上培养,培养温度 25 ~ 27℃,光照 16 h,光强 800 lx。培养 20 d 后剥出幼胚,接种于 MS 培养基上培养成苗。

1.4 基因组 DNA 提取及 RAPD 鉴定

取胚抢救得到的 F₁ 代幼苗的幼叶,用 CTAB 法提取基因组 DNA 并用紫外分光光度计检测其浓度与纯度。选择 100 个 10 碱基随机引物(上海生工生物工程公司)对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增程序如下:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,36℃复性 42 s,72℃延伸 90 s,共 40 个循环,然后 72℃延伸 10 min。4℃保存。经筛选,共有 11 条随机引物可以用于 F₁ 代的鉴定。

2 结果与分析

2.1 杂种 F₁ 代的获得

经过人工去雄授粉杂交,胚抢救获得了 F₁ 代杂交植株幼苗(图 1),从植株叶片外部形态来看,杂交

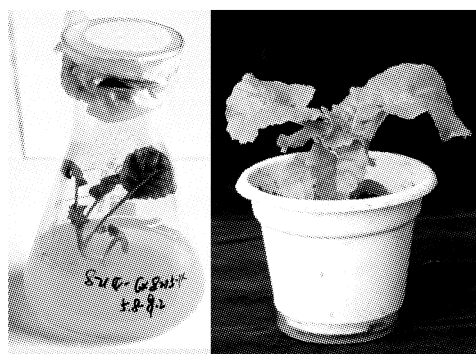


图 1 胚抢救得到的 F₁ 代幼苗(杂交苗)

Fig.1 F₁ plants after embryo rescue (F₁ hybrid)

株有别于两个亲本(萝卜、芥蓝),可初步判断该植株为杂交所得。

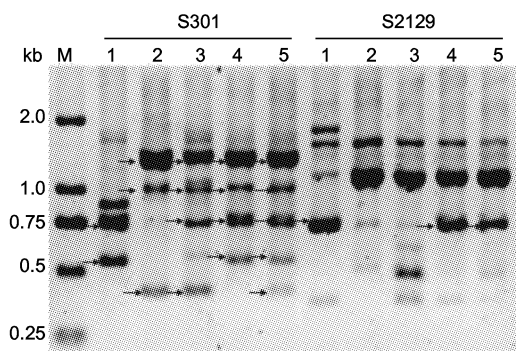
2.2 杂种 F₁ 代的 RAPD 鉴定

用 100 条 10 碱基随机引物对亲本以及杂种进行 PCR 扩增,其中有 11 条随机引物可以作为鉴定杂种之用,序列见表 1。

表 1 随机引物序列
Table 1 The bases of random primer

随机引物编号 Number	引物序列 The bases of primer
S2122	GGAAAGCCCA
S2153	AGTTGGGCAG
S169	TGGAGAGCAG
S302	TTCCGCCACC
S1216	CCTTGCGCCT
S506	GTCTACGGCA
S2129	GGCTCTGGGT
S301	CTGGGCACGA
S1220	TGCGCCATCC
S509	TGAGCACGAG
S2145	GTAGGTCGCA

通过胚抢救共获得 3 株杂交苗。11 条随机引物在杂交后代 F₁-1 中一共扩出 69 条 RAPD 条带。其中在双亲扩增位点中均可检出的条带有 12 条,占条带总数的 17.39%,仅在母本扩增位点检出的条带有 23 条,占条带总数的 33.33%,仅在父本扩增位点检出的条带有 31 条,占条带总数的 44.93%,另出现 3 条 F₁ 自身特异带,占条带总数的 4.35%。在杂交苗 F₁-2 中一共扩出 60 条 RAPD 条带,其中在双亲扩增位点中均可检出的条带有 11 条,占条带总数的 18.33%,仅在母本扩增位点检出的条带有 23 条,占条带总数的 38.33%,仅在父本扩增位点检出的条带有 25 条,占条带总数的 41.67%,出现 1 条 F₁ 自身特异带,占条带总数的 1.66%。在杂交苗 F₁-3 中一共扩出 65 条 RAPD 条带,其中在双亲扩增位点中均可检出的条带有 7 条,占条带总数的 10.77%,仅在母本扩增位点检出的条带有 22 条,占条带总数的 33.85%,在父本扩增位点检出的条带有 33 条,占条带总数的 50.77%,出现 3 条 F₁ 自身特异带,占条带总数的 4.62%。结果说明 F₁ 代材料在遗传基础上是来源于萝卜和芥蓝,为杂交所得。随机引物 S301 和 S2129 扩增电泳图见图 2。



M: DNA marker;泳道 1: 萝卜基因组进行的 PCR 扩增, 箭头示亲本中萝卜基因组的特有条带;泳道 2: 芥蓝基因组进行的 PCR 扩增, 箭头示亲本中芥蓝基因组的特有条带;泳道 3、4、5: 杂交植株基因组进行的 PCR 扩增, 箭头示扩出的两个亲本的特异条带

Lane M is DNA marker; Lane 1 is RAPD from *Raphanus sativus* L. genomic DNA, arrows show the specific bands of *R. sativus* L.; Lane 2 is RAPD from *Brassica alboglabra* Bailey genomic DNA, arrow shows the specific bands of *B. alboglabra* Bailey; Lane 3, 4, and 5 are RAPD from F_1 genomic DNA, arrow shows the specific bands of parents

图 2 随机引物 S301 和 S2129 扩增后的电泳图

Fig. 2 Results of RAPD amplifications using primers of S301 and S2129

3 讨论

远缘杂交是高等植物基因组进化和新物种形成的主要动力之一, 杂交可以综合亲本种的适应性或创造出新的适应性, 丰富基因库, 拓宽生境, 进而促进基因组进化和新种形成。由于生殖隔离, 亲缘关系较远的物种间杂交常常表现为不亲和性, 杂种的获得比较困难。远缘杂交的 F_1 代, 在遗传上有3种可能: 含有全部或部分双亲遗传物质的真杂种, 或由母本植株孤雌生殖或自交形成的假杂种, 或父本大量 DNA 被母本核酸酶消化, 少量片段整合进母本基因组, 形成的渗入型杂种^[5], 弄清它们的遗传组成是实施进一步研究的基础。

为了将 *Brassica tournefortii* (TT) 的核基因转移到 *B. carinata* (BBCC) 中, Mukhopadhyay 等^[6]通过 *B. tournefortii* $\times$ *B. oleracea* 的 F_1 (TC) 与 *B. nigra* (BB) 进行原生质体融合, 得到桥梁物种 (TCBB), 用 12 对亲本间有多态性的 RAPD 引物对 15 个体细胞杂种的鉴定表明, 所有杂种都有 3 个亲本的基因组特异带, 表明杂种中同时存在 T、B 和 C 3 个基因组, 并通过 RFLP 标记证实杂种中含有来自 *Brassica tournefortii* 和 *B. nigra* 两个亲本的叶绿体和线粒体基因组。Chrungu 等^[7]通过属间杂交和染色体加倍合成了 *B. maurorum*-*B. napus*, *B. maurorum*-

B. carinata, *B. maurorum*-*B. nigra* 异源四倍体, 通过 RAPD 和 RFLP 技术证实了杂种的真实性。

本研究用萝卜属的萝卜和芸薹属的芥蓝为亲本进行杂交, 通过胚抢救获得杂交植株 F_1 , RAPD 检测证实了杂种 F_1 代的真实性。结果表明, F_1 代中遗失了一些父母本的特异带或共有带, 这可能是由于远缘杂交使得基因重组, 改变了某些片段的引物结合位点, 从而导致 F_1 代中 DNA 带的出现或消失^[8]。另外, 父本或母本中原本具有相同分子量而没有分开的几条带也有可能由于在杂交中发生基因重组, 导致 F_1 代中较为复杂的变化, 这种情况在种内较少发生, 而在种间发生的可能性较大^[9]。

越来越多的研究表明, 植物远缘杂交以及此后的多倍体化过程可以产生大量的遗传和表观遗传变异。显然, 进一步深入研究这些问题对于阐明远缘杂交的机制和规律性, 对于深入理解杂交与进化的关系、杂交导致新种形成的机制、以及杂种优势高效利用新途径等问题都具有重要意义。

参考文献:

- [1] 程雨贵, 吴江生, 陈洪高, 张明海. 萝卜和甘蓝远缘杂交研究[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(1): 1-6.
- [2] 黄永芬, 汪胤胤, 王海廷. 从番茄过氧化物酶同工酶表型差异探讨杂种优势机理[J]. 遗传学报, 1985, 12(3): 193-199.
- [3] 史文忠, 郭文武, 邓秀新. 柑桔 RAPD 技术体系建立与体细胞杂种鉴定[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 105-110.
- [4] 栾雨时, 苏乔, 李海涛, 安利佳, 何孟元. 利用 RAPD 技术快速鉴定番茄杂种纯度[J]. 园艺学报, 1998, 25(3): 247-251.
- [5] 周光宇, 龚葵葵, 王自芬. 远缘杂交的分子基础[J]. 遗传学报, 1979, 6(4): 405-413.
- [6] Mukhopadhyay A, Arumugam N, Pradhan A K, Murthy H N, Yadav B S, Sodhi Y S, Pental D. Somatic hybrids with substitution type genomic configuration TCBB for the transfer of nuclear and organelle genes from *Brassica tournefortii* TT to allotetraploid oilseed crop *B. carinata* BBCC[J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 19-25.
- [7] Chrungu B, Verma N, Mohanty A, Pradhan A, Shivanna K R. Production and characterization of interspecific hybrids between *Brassica maurorum* and crop *Brassicas*[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 608-613.
- [8] 孙致良, 张超良, 金德敏, 孙世孟, 郭宝太, 孙克莲, 王斌. RAPD 技术在玉米自交系亲缘关系研究中的应用[J]. 遗传学报, 1999, 26(1): 61-68.
- [9] Castagna R, Gnocchi S, Perenzin M, Heun M. Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 424-430.

(责任编辑: 张平)