科学通报
第41卷 第14期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996年7月

# 芸苔属花粉-体细胞杂种植株的生长发育及分子生物学鉴定*

李昌功 周 嫦 杨弘远**
(武汉大学生命科学学院植物生殖生物学研究室,武汉 430072)
李香花 张启发
(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,武汉 430070)

关键词 配子-体细胞杂种 RAPD 芸苔属

"配子-体细胞杂交(gameto-somatic hybridization)"是植物性细胞操作研究的重要组成部分,近十年来取得了较大进展. 小孢子四分体原生质体. 幼嫩花粉原生质体以及成熟花粉原生质体与体细胞原生质体的融合先后均再生杂种植株成功[1~3]. 但迄今的研究多集中于茄科植物,而且关于杂种植株的结实等方面尚无肯定的报道[1,3,4]. 李昌功等由芸苔属幼嫩花粉原生质体与下胚轴原生质融合再生了3个小植株,并经染色体计数和酯酶同工酶酶谱分析初步鉴定出一株是异源三倍体,两株是异源四倍体[2]. 本文报道这3个小植株的生长发育情况以及运用RAPD(Random amplified polymorphic DNA)[5]标记技术进一步对其杂种特性鉴定的结果.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及杂种植株生长发育的观察

将青菜(*Brassica chinensis* L.)幼嫩花粉原生质体与甘蓝型油菜(*B. napus* L.)下胚轴原生质体融合再生的3个小植株[2]通过切段繁殖的方法扩增其数量,将高达5cm以上的植株移入田间. 以同期的双亲植株作对照,观察比较其生长发育情况. 用荧光素二醋酸酯(FDA)染色反应测定成熟花粉的生活力. 解剖果实以检查种子形成情况.

### 1.2 植物总DNA的提取

采用张启发等[6]修改过的CTAB法,从5棵杂种植株(1号苗(异源三倍体)2株、2号苗(异源四倍体)2株、3号苗(异源四倍体)1株)的新鲜叶片中抽提DNA,并经等体积的苯酚、氯仿纯化.

### 1.3 RAPD分析

共选用10个华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室合成的随机10聚(10-mers)引物,按王风平[1)]确定的条件(反应体积25 μL,含10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3,50 mmol/L KCl,

1995-6-19收稿,1996-2-8收修改稿
* 国家自然科学基金资助项目
** 联系人
1)王风平. 利用RAPD技术寻找光敏核不育水稻基因连锁分子标记及其定位. 华中农业大学硕士论文,1995,5

2.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L 每种 dNTP, 10 μmol/L 引物, 20 ng 基因组 DNA, 1.5 U Taq DNA 聚合酶), 于自动 PCR 扩增仪(PERKIN ELEMER Cetus 9 600)上进行扩增反应:95℃下预变性 3 min 后转入下述循环:94℃ 1 min→38℃ 1 min→75℃ 1.5 min, 循环 40 次后转入 72℃延伸 8 min, 最后于 4℃下保存. 扩增产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳(1 V/cm 条件下在 1× TAE 缓冲溶液中), 溴化乙锭染色后于紫外光下观察、拍照.

## 2 结果

### 2.1 杂种植株生长发育的特点

与青菜、甘蓝型油菜双亲相比, 花粉-体细胞杂种植株的生长较为缓慢, 株型瘦小, 腋芽萎缩, 很少或无分枝, 亦有顶分 2 枝且近乎均等发育的现象(图 1). 杂种植株叶片的形状和大小介于双亲之间, 花蕾比双亲的大. 经 FDA 染色反应检测到的成熟花粉的生活率, 异源三倍体植株的是 62.4%, 异源四倍体植株的是 68.7%, 均比同期生长的双亲植株的低(青菜为 77.8%, 甘蓝型油菜的是 81.6%). 杂种植株的子房皆发育成果实(图 2), 其中异源三倍体植株的角果粗短, 内无种子但有胚珠退化的残迹; 异源四倍体植株的果实细长, 其胚珠形成种子, 但结籽率较双亲为低.

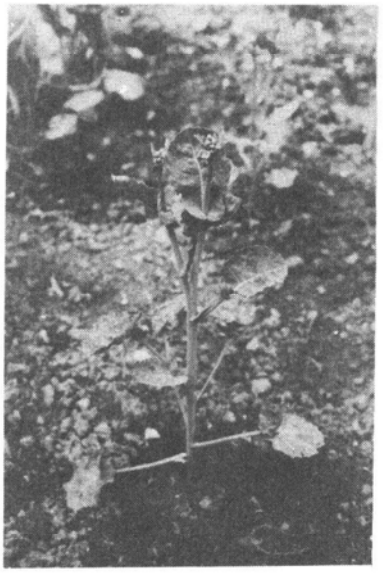

图 1 已形成花蕾的异源三倍体植株

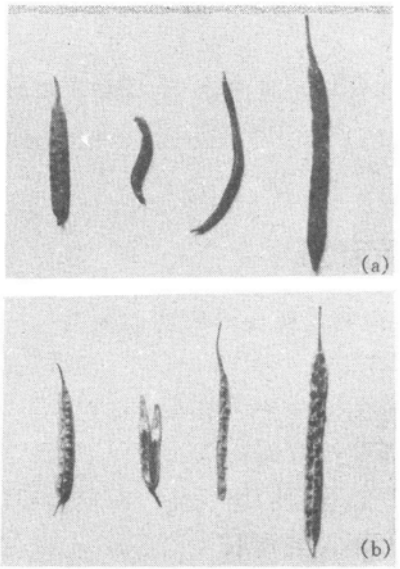


图 2 杂种植株及其双亲的果实外观(a)与其内部种子的情况(b)

从左到右依次为:青菜、异源三倍体、异源四倍体、甘蓝型油菜

### 2.2 杂种植株的 RAPD 分析

所用的 10 个 10 聚引物除 RA04 未扩增出清晰的 DNA 带型外, 其它 9 个均扩增出数目在 1～8 之间的 DNA 片段. 其片段的多少随引物及模板 DNA 的不同而异, 片段的大小在 250～2 500 bp 之间. 从扩增产物的带型看, 引物 RA32 与 RA58 扩增出的 DNA 片段在亲本间无多态性; RA08, 18, 42, 53 的扩增结果中, 青菜的 DNA 片段数目虽少于甘蓝型油菜的, 但每个片段的大小却与后者相同, 5 棵杂种植株的 DNA 片段基本上与甘蓝型油菜一致; RA34, 39, 59 的

扩增产物明显地表现出双亲之间的多态性，5 个被检测的花粉-体细胞杂种植株的扩增产物均含有双亲植株的主要 DNA片段，同时也丢失了个别较弱的亲本 DNA 带．图 3 示 RA34 的扩增结果，从中可见 5 个杂种植株均含有 900 bp的一条青菜 DNA 片段和 350 bp、650 bp 以及 1 300 bp 大小的 3 条甘蓝型油菜的 DNA 片段，700 bp 的 DNA 片段在所有植株间无多态性．3 次重复的结果均相同．

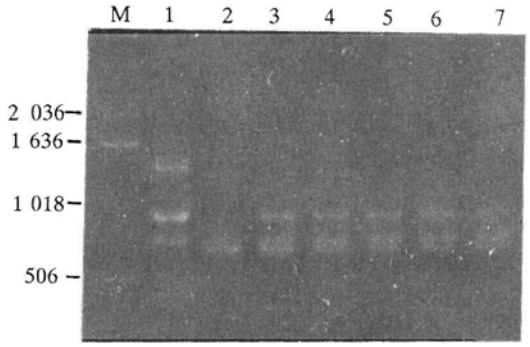


图 3　5 个杂种植株及其双亲 DNA 的 RAPD 的电泳结果

M 为分子量标记．1——青菜，2——甘蓝型油菜，3～4——异源三倍体，5～7——异源四倍体

## 3　讨论

异源多倍体植株的育性如何是育种工作中关注的问题．现有的“配子-体细胞杂交”研究中，仅 Pirrie 和 Power 提到 *N. glutinosa* 和 *N. tabacum* 的三倍体杂种植株花粉的生活力远比双亲为低的现象[1]，其他的研究者仅提到杂种植株的花粉败育或无活力[3,4]，而均没有结实的报道．本文中青菜与甘蓝型油菜的异源三倍体植株虽然产生了有活力的花粉粒，子房发育成果实，但未结种子，而异源四倍体植株则正常结籽，同理论预期结果一致．

RAPD 标记是利用 PCR 技术与随机引物对基因组 DNA 序列进行扩增产生随机多态性 DNA 片段的分子生物学技术[5]．近年已用于鉴定体细胞杂种[7]．本文中的 RAPD 标记结果提供了花粉-体细胞原生质体融合再生植株的杂种本质的直接的 DNA 分子水平的证据．综合前文中的染色体计数、酯酶同工酶酶谱分析[2]以及本文的形态学和分子生物学等多方面的证据，可以断定本实验中花粉原生质体的遗传物质经由配子-体细胞杂交途径已传给子代．这是用 RAPD 标记技术对配子-体细胞杂交再生植株的杂种性质鉴定成功的首次报道．

## 参　考　文　献

1　Pirrie A, Power J B. The production of triploid somatic hybrid plants(*Nicotiana glutinosa*(n) + *N. tabacum*(2n)) via gametosomatic fusion. Theor Appl Genet, 1986, 72:48～52

2　李昌功，周　嫦，杨弘远．芸苔属花粉——下胚轴原生质体融合再生杂种小植株．植物学报，1994，36:905～910

3　Desprez B, Chupean M C, Vermeulen A *et al*. Regeneration and characterization of plants produced from mature tobacco pollen protoplasts via gameto-somatic hybridization. Plant Cell Rep, 1995, 14:204～209

4　Lee C H, Power J B. Intra- and interspecific gametosomatic hybridization within the genus *Petunia*. Plant Cell Tissue Ogan Culture, 1988, 76:237～243

5　Willams J G K, Kubelik A, Levak K J *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 1990, 18:6 531～6 535

6　张启发，段国录，杨官品．中国大麦叶绿体 DNA 和核糖体 RNA 基因限制性片段长度多型性．遗传学报，1992，19:131～139

7　Xu Y S, Clark M S, Pehu E. Use of RAPD markers to screen somatic hybrids between *Solanum tuberosum and S. brevidens*. Plant Cell Rep, 1993, 12:107～109