

• 简讯 •

## 原生质体非对称融合法获得花椰菜与 *ogura* CMS 甘蓝型油菜种间杂种

### Interspecific Somatic Hybrids Between *Brassica oleracea* var. *botrytis* and *Ogura* Type CMS *Brassica napus* via Asymmetric Protoplast Fusion

惠志明<sup>1</sup>, 刘凡<sup>2</sup>, 简元才<sup>2</sup>, 申书兴<sup>1</sup>, 赵泓<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学园艺学院, 保定 071001; <sup>2</sup>国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100089)

花椰菜是中国重要的蔬菜作物之一, 其杂种一代的生产主要有两条途径: 一是利用自交不亲和系; 二是利用雄性不育系。利用雄性不育系配制一代杂种能克服自交不亲和系所带来的亲本繁殖难度大、亲本多代自交退化、杂交率易受留种环境制约等缺点。花椰菜具有很强的杂种优势, 应用杂种是花椰菜获得丰产、稳产和优质的一项重要措施。而利用细胞质雄性不育系生产杂交种子, 可以简化制种程序, 保证种子纯度, 降低制种成本。

*Ogura* 萝卜细胞质雄性不育系是十字花科作物中研究最多、利用最广泛的细胞质雄性不育类型之一, 其不育性、不育率和不育度均为 100%, 具有很高的利用价值。通过有性杂交再回交的方法, 即使可以实现胞质雄性不育性在不同种间或种内的转育, 一般也需要 6~11 年的时间, 而利用原生质体非对称融合技术可以更容易地实现胞质基因的种间或种内的转移, 获得更多基因型的杂种, 而且转育时间更短, 同时也有利于恢复杂种植株受体亲本的农艺性状。目前, 通过原生质体融合技术已经在甘蓝型油菜、不结球白菜、胡萝卜等蔬菜作物上转移胞质雄性不育性状或抗除草剂性状获得成功。

笔者以甘蓝型油菜萝卜细胞质雄性不育 (*ogura* cytoplasmic male sterility, *ogura* CMS) 系无菌苗的叶肉原生质体为供体材料, 经 0.0250~0.9600 J·cm<sup>-2</sup> 的紫外线辐射处理后, 与花椰菜傲雪 1 号 (受体) 的下胚轴原生质体进行 PEG 介导-融合, 共获得 68 株再生植株。经同工酶、RAPD 与 STS (sequence tagged site) 标记和形态学鉴定, 结果显示有 32 株为杂种植株。本鉴定体系的研究结果还表明, STS 标记鉴定结果与同工酶 POX、PGM 的酶谱鉴定结果一致性较强, 而与 RAPD 鉴定结果差异较大。如在同工酶分析及 STS 标记引物扩增中显示为杂种的 8 株再生株, 在 RAPD 分析中却只呈现出受体的 RAPD 扩增谱带。由于 RAPD 分

子标记只能反映植物基因组很少一部分的组成情况, 而本融合 (非对称融合) 采用了紫外辐射处理供体原生质体, 旨在造成供体染色体在融合细胞中的部分丢失或缺损, 以减少非目标性状的引入。这个结果可能证明了这类再生株为非对称融合体。从本研究可以看出在非对称融合试验中, 综合运用多种手段进行杂种植株的鉴定是必需的, 单独应用其中一种可能会导致部分杂种植株被鉴定为阴性, 从而丢失一些有价值的材料。由于本试验的目的是导入 *ogura* 雄性不育胞质, 因此就该目的来说, 在融合细胞获得愈伤组织时期或获得再生植株初期即用 STS 标记引物进行杂种筛选, 可以大大减少后期培养和鉴定的工作量。

试验考察了不同紫外线处理剂量对融合后原生质体培养及其植株再生的影响。发现随着紫外辐射剂量的增加, 融合细胞的分裂进程无明显变化, 但是形成的愈伤组织的数量有明显减少的趋势; 紫外辐射剂量越高, 获得的杂种植株越容易生根, 其叶形、叶色更倾向于受体亲本。利用流式细胞仪对已鉴定为杂种的植株进行了倍性分析, 发现 80% 的杂种植株其细胞 DNA 含量高于供、受体亲本之和。染色体检查显示, 所有杂种植株的染色体数目均为 50~56 条, 出现这种差异的具体原因还有待于进一步探讨。事实上, 无论是染色体计数还是流式细胞仪 DNA 含量分析, 都不能鉴别杂种植株染色体的具体构成情况及来源。因此, 在以后的工作中可以利用 AFLP、GISH 或 FISH 等试验手段对非对称融合杂种的非对称水平、染色体来源及紫外线辐射剂量与供体染色体丢失之间的关系进行进一步研究。

本研究利用原生质体非对称融合技术获得了含有 *ogura* 雄性不育胞质的花椰菜再生植株, 为最终获得胞质杂种奠定了基础, 同时也为该雄性不育胞质的快速转移及杂种优势的利用开辟了新的途径。