

娄丽娜, 刘 哲, 许园园, 等. 萝卜与芜菁异源三倍体杂种的获得及鉴定[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 881-889.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.024

## 萝卜与芜菁异源三倍体杂种的获得及鉴定

娄丽娜, 刘 哲, 许园园, 苏小俊

(江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了探讨萝卜和芜菁属间杂交的亲性和, 以及为开展萝卜和芜菁远缘杂交育种提供参考, 以 7 份不同类型的萝卜材料为母本, 6 份不同类型的芜菁材料为父本进行属间杂交, 人工授粉过程中采用 100 mg/L 甘氨酸 (Gly)、60 mg/L 赤霉素 ( $GA_3$ ) 和 5% 氯化钠 (NaCl) 溶液涂抹柱头的方法, 促进受精及子房和胚的发育, 以涂抹清水为对照, 然后用组织培养方法对杂种种子进行无菌苗培养。通过调查授粉后 7 d、14 d 及 21 d 的杂交结荚率及 7~21 d 的结荚率差值, 分析萝卜和芜菁属间杂交的亲性和; 然后通过形态学和细胞学鉴定, 确定杂种的真实性。结果表明: 授粉后 7 d, 结荚率较高, 随着授粉后时间的推移, 结荚率迅速减少。不同杂交组合以及不同处理, 对结荚率和结籽率的影响不同, 组合 R5×W4 的结荚率保持最好, 且结荚率最高; Gly 处理对结荚率的保持效果较好,  $GA_3$  处理获得种子的组合数量最多且结籽率最高。7 个杂交组合获得 74 粒种子, 出苗 4 株, 经鉴定, 在组合 R9×W9 上使用 Gly 处理, 获得 1 株异源三倍体的属间杂种苗 ( $3n=28$ ), 杂种高度不育, 未获得萝卜和芜菁的双单倍体杂种后代。

**关键词:** 萝卜; 芜菁; 属间杂交; 异源三倍体杂种

**中图分类号:** S631.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0881-09

## Production and identification of an allotriploid hybrid of radish (*Raphanus sativus* L.) × turnip (*Brassica rapa* L. spp. *rapa*)

LOU Li-na, LIU Zhe, XU Yuan-yuan, SU Xiao-jun

(Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To analyze the crossability of radish and turnip, the distant hybridization between seven types of radish and six types of turnip materials were made in this study. Gly (100 mg/L),  $GA_3$  (60 mg/L), and NaCl (5%) solutions were spread on stigmas to accelerate fertilization and improve development of ovaries and ovules. Water was used as control. At 7 d, 14 d, and 21 d after pollination, the pod setting rate and its difference between 7 d and 21 d were investigated. The pod setting rate was high at 7 d after pollination, and decreased over time. The pod and seed setting rates varied in cross combinations and treatments. Cross combination R5×W4-2 showed the highest pod setting rate and the smallest pod setting rate drop. The Gly treatment had better effect on maintaining the pod setting rate.  $GA_3$ -treated cross combinations got the highest number of seeds and the highest seed setting rate. Four seedlings emerged from 74 seeds of 7 crosses. One allotriploid hybrid ( $3n=28$ ) was identified as highly sterile from Gly-treated combination R9×W9-1. No dihaploid hybrid was produced.

**Key words:** radish; turnip; intergeneric hybridization; allotriploid hybrid

收稿日期: 2017-03-27

基金项目: 江苏省自然科学基金(青年基金)项目(BK20130726); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(16)1012]

作者简介: 娄丽娜(1982-), 女, 河南濮阳人, 博士, 副研究员, 研究方向为蔬菜作物遗传育种。(Tel) 025-84391221; (E-mail) linabeibei@163.com

通讯作者: 苏小俊, (E-mail) xiaojunsu@yahoo.com

远缘杂交是指不同种或亚种间以及种以上亲缘

关系更远的个体间的杂交,人为促进不同物种的基因渐渗和交流。远缘杂交是将有利性状转入目标材料从而获得新物种的有效途径,同时也是研究物种间的亲缘关系,创建特殊遗传材料,如异源染色体附加系、代换系和易位系等的重要途径。芸薹属植物属间杂交是建立十字花科种质资源库的主要途径之一,萝卜属植物中存在着许多对芸薹属栽培作物有利的性状,除了含有细胞质雄性不育基因和恢复基因、自交不亲和基因外<sup>[1-2]</sup>,还具有优良的抗病抗虫能力,如抗根结线虫和抱囊线虫<sup>[3-4]</sup>,抗软腐病、黑腐病、根肿病,耐菌核病<sup>[5]</sup>。芜菁(*Brassica campestris* L. spp. *rapifera* Sinsk, syn *B. rapa* L. spp. *rapifera*,  $2n=20$ , AA)是十字花科芸薹属芸薹种芜菁亚种,同萝卜(*Raphanus sativus* L.,  $2n=18$ , RR)一样,都是以其肥大肉质根供食用,但风味、营养价值不同。这两种物种如果杂交成功,有可能对肉质根的品质产生影响,可能创造出新风味的物种,或者改良原有物种的品质,或者作为桥梁物种把萝卜属中的优异基因转移到芸薹属中,具有广阔的应用前景。

通过远缘杂交育种手段,已经获得萝卜属和芸薹属间的双二倍体杂种<sup>[6-7]</sup>,并被命名为新的物种。娄丽娜等<sup>[8]</sup>汇总了过去几十年里获得成功的萝卜和芸薹属杂交组合。在 *R. sativus* × *B. nigra*<sup>[9]</sup>、*R. sativus* × *B. oleracea*<sup>[10-13]</sup>、*R. sativus* × *B. juncea*<sup>[14]</sup>、*R. sativus* × *B. napus*<sup>[15-17]</sup> 以及 *B. nigra* × *R. sativus*<sup>[9]</sup>、*B. oleracea* × *R. sativus*<sup>[10-11,18]</sup>、*B. rapa* × *R. sativus*<sup>[19-22,11]</sup>、*B. carinata* × *R. sativus*<sup>[19,23]</sup>、*B. juncea* × *R. sativus*<sup>[24]</sup>、*B. napus* × *R. sativus*<sup>[25]</sup>、*B. japonica* × *R. sativus*<sup>[26]</sup> 等组合中获得了远缘杂交的成功,通过体细胞融合等技术在 *B. napus* 和 *R. sativus*<sup>[27]</sup>、*B. campestris* ssp. *pekinensis* 和 *R. sativus*<sup>[28]</sup> 组合中也获得了远缘杂交的成功。通过远缘杂交的方式,萝卜的许多优异性状,如抗白锈病<sup>[29]</sup>、抗线虫<sup>[3,17,30-31]</sup>、抗根肿病<sup>[32-33]</sup> 以及雄性不育<sup>[34]</sup> 等性状被转入到了芸薹属植物中。

目前,萝卜和芜菁杂交成功的报道较少。梅时勇等<sup>[35]</sup>采用花期重复授粉以及对授粉后荚果内种胚进行离体培养的方法,获得萝卜与芜菁属间远缘杂交种,但未对杂种的真实性进行鉴定。房相佑等<sup>[36]</sup>在研究萝卜与芸薹野生种属间杂交时发现,萝卜与芸薹种杂交时,芸薹种的花粉能较好地萌发,但是花粉管伸长受到很大妨碍,只有少数花粉管到达

胚珠,受精后障碍相对较轻,母体内杂种胚很多能发育成熟。Lou 等以芜菁为母本,萝卜为父本,进行属间远缘杂交,获得 24 株属间双单倍体远缘杂种<sup>[37]</sup>。本研究为了打破萝卜作为母本进行远缘杂交时的授粉前障碍,采用蕾期授粉,并参考周芳菊<sup>[38]</sup>的方法,在人工授粉中采用甘氨酸、赤霉素和氯化钠溶液涂抹柱头,促进受精及子房和胚的发育,并进行萝卜和芜菁属间杂交亲和性分析,对杂交成功的杂种后代进行植物学性状和染色体数目鉴定,旨在创造萝卜和芜菁属间杂种的新型遗传材料,作为桥梁物种促进萝卜属和芸薹属间的基因交流,为探明物种间的种属进化关系,以及开展萝卜和芜菁属间远缘杂交育种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

7 份萝卜材料、6 份芜菁材料见表 1,其中商品种来源于市场。

表 1 萝卜和芜菁属间远缘杂交材料

Table 1 Radish and turnip species used as parents for intergeneric hybridization

| 材 料  | 试验<br>编号 | 品种名称    | 类型  |
|--|----------|---------|-----|
| 萝卜( <i>Raphanus sativus</i> )                        | R1       | 抚顺红萝卜   | 商品种 |
|  | R4       | 高糖青萝卜   | 商品种 |
|  | R5       | 北京满堂红   | 商品种 |
|  | R6       | 黑 3-6   | 自交系 |
|  | R8       | 夏白玉     | 商品种 |
|  | R9       | 奇山老不糠 1 | 商品种 |
|  | R10      | 501 水萝卜 | 商品种 |
|  | W1       | 菜用芜菁 1  | 自交系 |
|  | W3       | 菜用芜菁 3  | 自交系 |
|  | W4       | 菜用芜菁 4  | 自交系 |
| 芜菁( <i>Brassica campestris</i> L. spp. <i>rapa</i> ) | W7       | 芜菁      | 商品种 |
|  | W8       | 红圆蔓菁    | 商品种 |
|  | W9       | 圆蔓菁     | 商品种 |

### 1.2 杂交授粉

试验在江苏省农业科学院蔬菜所六合基地试验大棚内进行。为保证花期相遇,2014 年 10 月、

11月分别播种萝卜、芜菁材料,常规田间管理。2015年春季3~4月份,以萝卜为母本,芜菁为父本,配制属间杂交组合,人工去雄、蕾期授粉。在杂交前,对母本花序进行整理,去除已经开放的花朵及花序中间特别小的花蕾,保留花序外围大小合适的花蕾,进行剥蕾、去雄。在人工授粉过程中采用100 mg/L甘氨酸(Gly)、60 mg/L赤霉素(GA<sub>3</sub>)和5%氯化钠(NaCl)对授粉前母本柱头进行滴浸,并以清水滴浸为对照。取套袋父本开花当天的花药,涂抹母本柱头,授粉后套袋,并挂牌标记杂交组合、授粉时间、杂交花数。于授粉后7 d、14 d、21 d调查结荚情况,统计结荚率。结荚率=(种荚数/杂交花数)×100%。使用SASS 18.0软件,对不同杂交组合、不同处理的7~21 d结荚率差值进行差异显著性分析。

### 1.3 杂种培育

2015年6月中旬,种荚成熟后,陆续采收、脱粒,统计收获种子数量并进行编号。2015年10~12月,采用组培方法培养杂种苗。将种子用70%乙醇消毒1 min,再用6%次氯酸钠溶液处理15 min,接着用无菌水冲洗4~5次,用无菌滤纸吸干种子上残存水分,最后接种于1/2 MS培养基上,每瓶接种10~15粒种子。培养瓶置于组织培养室内培养,培养条件为:温度25℃,光照时间16 h/d,光照度2 000 lx。待无菌苗生长至根系较壮后进行驯化。驯化前1 d,揭开瓶盖进行练苗,之后移栽至盛装无菌营养土的小钵中,遮阳网遮盖,培养7 d,然后移栽入塑料大棚中,进行常规管理。统计接种数和成苗数,计算结籽率和杂种获得频率,结籽率=(结籽数/杂交花数)×100%,杂种获得频率=(杂种植株数/杂交花数)×100%。

### 1.4 杂种的形态学和细胞学鉴定

2016年1~6月,对属间杂种进行形态学和细胞学鉴定,并尝试对属间杂种材料进行授粉保存。对杂种苗及其双亲,进行形态学鉴定。采用米尺、直尺以及游标卡尺,分别统计其株高、叶形、叶片大小(长×宽)、花色、花蕾大小(长×直径)、花萼大小(长×宽)、花瓣大小、雄蕊长、雌蕊长,记录花粉情况,每次测量重复3次,取平均值。

杂种的细胞学鉴定方法:取花序上直径为0.5~1.0 mm的小花蕾,用改良卡诺液(乙醇:氯仿:乙酸=5:2:3)固定24 h,于4℃冰箱保存备用。

取出花蕾,解剖镜下剥出花药,转移花药至70%乙醇中,随后倒掉乙醇,用蒸馏水冲洗干净,接着在37℃恒温下,用4%纤维素酶和4%果胶酶混合溶液对花药进行酶解2 h,然后挑取部分组织转移至载玻片上,加DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)于组织上,在显微镜下观察,并记录染色体数。

## 2 结果与分析

### 2.1 萝卜与芜菁杂交的亲本性

以7份不同类型的萝卜材料为母本,6份芜菁材料为父本,进行随机杂交试验。授粉初期,种荚膨大不明显,生长缓慢,随着时间的推移,大部分种荚逐渐黄化脱落,只有极少数能够继续发育膨大。在授粉后7 d,大部分杂交组合都有较高的结荚率,但不同杂交组合以及同一组合不同处理间的结荚率差别较大(表2)。结荚率较高的组合有R1×W1、R4×W3,其不同处理的结荚率高达96.00%以上,甚至100.00%;其次是组合R9×W9,其Gly处理的结荚率为81.67%,NaCl、GA<sub>3</sub>处理的结荚率分别为96.57%、97.71%,然而其对照最高,达到100.00%;在组合R5×W4、R10×W9中,Gly处理降低了结荚率,分别为52.50%、79.57%,而其他处理仍然维持较高的结荚率;类似的组合还有R8×W7,其GA<sub>3</sub>处理较低,只有67.94%,而其他处理相对较高;组合R6×W8,4个处理的结荚率与其他组合相比均较低,仅GA<sub>3</sub>处理达到了86.85%,对照及NaCl、Gly处理的结荚率分别为68.67%、64.26%、72.54%。

授粉后14 d,由于远缘杂交的不亲和性,种荚黄化、脱落,各组合、各处理的结荚率迅速减小。通过比较发现:组合R8×W7 NaCl处理和对照的结荚率最高,分别为78.91%、76.40%;其次为R4×W3组合的NaCl处理(结荚率为66.67%)、组合R10×W9的GA<sub>3</sub>处理(63.88%)、组合R9×W9的对照(60.75%);结荚率低于60.00%的组合有R1×W1、R5×W4和R6×W8,而且组合R6×W8的各处理结荚率均较低,其GA<sub>3</sub>处理的结荚率为0,其最高的对照也只达到10.84%。

授粉后21 d,结荚率与授粉后14 d相比,继续减少,组合R1×W1和R10×W9的对照、组合R6×W8的Gly和GA<sub>3</sub>处理结荚率均降为0。结荚率最高的为组合R5×W4 GA<sub>3</sub>处理(31.58%),而其他组合的结荚率基本为0~18.00%。

表 2 萝卜和芜菁杂交的亲合性

Table 2 The compatibility of the crosses between *R. sativus* × *B. rapa* L.ssp. *rapa*

| 杂交组合   | 处理              | 授粉花数 | 授粉后 7 d |        | 授粉后 14 d |        | 授粉后 21 d |        |
|--------|-----------------|------|---------|--------|----------|--------|----------|--------|
|        |                 |      | 结荚数     | 结荚率(%) | 结荚数      | 结荚率(%) | 结荚数      | 结荚率(%) |
| R1×W1  | CK              | 181  | 181     | 100.00 | 47       | 25.97  | 0        | 0      |
|        | NaCl            | 165  | 160     | 96.97  | 70       | 42.42  | 12       | 7.27   |
|        | Gly             | 204  | 204     | 100.00 | 30       | 14.71  | 2        | 0.98   |
|        | GA <sub>3</sub> | 199  | 195     | 97.99  | 59       | 29.65  | 22       | 11.06  |
| R4×W3  | CK              | 281  | 281     | 100.00 | 53       | 18.86  | 3        | 1.07   |
|        | NaCl            | 258  | 258     | 100.00 | 172      | 66.67  | 39       | 15.12  |
|        | Gly             | 246  | 242     | 98.37  | 78       | 31.71  | 19       | 7.72   |
|        | GA <sub>3</sub> | 218  | 218     | 100.00 | 31       | 14.22  | 2        | 0.92   |
| R5×W4  | CK              | 32   | 29      | 90.63  | 7        | 21.88  | 3        | 9.38   |
|        | NaCl            | 47   | 47      | 100.00 | 19       | 40.43  | 6        | 12.77  |
|        | Gly             | 40   | 21      | 52.50  | 6        | 15.00  | 1        | 2.50   |
|        | GA <sub>3</sub> | 152  | 152     | 100.00 | 85       | 55.92  | 48       | 31.58  |
| R6×W8  | CK              | 83   | 57      | 68.67  | 9        | 10.84  | 1        | 1.20   |
|        | NaCl            | 263  | 169     | 64.26  | 21       | 7.98   | 8        | 3.04   |
|        | Gly             | 244  | 177     | 72.54  | 6        | 2.46   | 0        | 0      |
|        | GA <sub>3</sub> | 251  | 218     | 86.85  | 0        | 0      | 0        | 0      |
| R8×W7  | CK              | 161  | 161     | 100.00 | 123      | 76.40  | 16       | 9.94   |
|        | NaCl            | 147  | 143     | 97.28  | 116      | 78.91  | 21       | 14.29  |
|        | Gly             | 221  | 181     | 81.90  | 105      | 47.51  | 13       | 5.88   |
|        | GA <sub>3</sub> | 209  | 142     | 67.94  | 65       | 31.10  | 25       | 11.96  |
| R9×W9  | CK              | 186  | 186     | 100.00 | 113      | 60.75  | 32       | 17.20  |
|        | NaCl            | 204  | 197     | 96.57  | 90       | 44.12  | 10       | 4.90   |
|        | Gly             | 251  | 205     | 81.67  | 141      | 56.18  | 40       | 15.94  |
|        | GA <sub>3</sub> | 218  | 213     | 97.71  | 129      | 59.17  | 31       | 14.22  |
| R10×W9 | CK              | 100  | 95      | 95.00  | 42       | 42.00  | 0        | 0      |
|        | NaCl            | 280  | 280     | 100.00 | 165      | 58.93  | 45       | 16.07  |
|        | Gly             | 186  | 148     | 79.57  | 82       | 44.09  | 27       | 14.52  |
|        | GA <sub>3</sub> | 227  | 227     | 100.00 | 145      | 63.88  | 39       | 17.18  |

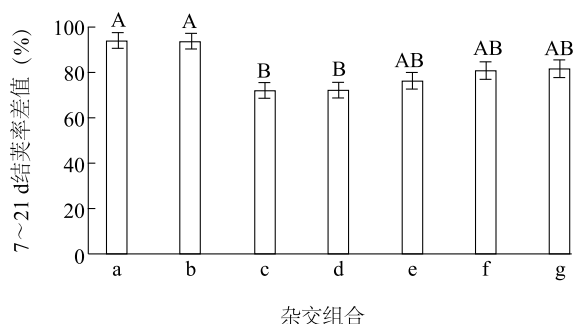
Gly、GA<sub>3</sub>、NaCl 处理是指在人工授粉过程中分别用 100 mg/L 甘氨酸、60 mg/L 赤霉素和 5% 氯化钠处理母本柱头,对照 (CK) 以清水处理。

授粉后随着时间的推缓,结荚率迅速降低,但不同组合、不同处理的变化不同(图 1、图 2)。结荚率降低最多的组合为 R1×W1 和 R4×W3,结荚率降低最少的组合为 R5×W4 和 R6×W8。降低最多和最少的组合之间差异显著。虽然组合 R6×W8 的 7~21 d 结荚率降低程度较少,但是其初始结荚率即授粉后 7 d 的结荚率最低,且与其他组合相比,其结荚率在 14 d 时已经降到最少。综合考虑,杂交组合 R5×W4

的结荚率保持最好。

从图 2 可以看出,Gly 处理的结荚率降低最少,与对照相比差异达到显著水平,而其他处理间差异不显著,可见使用 Gly 处理对结荚率的保持起到了较好的作用。然而,结荚率降低最少的组合 R5×W4 的 4 个处理中,Gly 处理的效果最差(表 2),这说明虽然 Gly 处理对多数杂交组合的结荚率保持有较好的作用,但具体到个别杂交组合,其效果却并不一定最好。

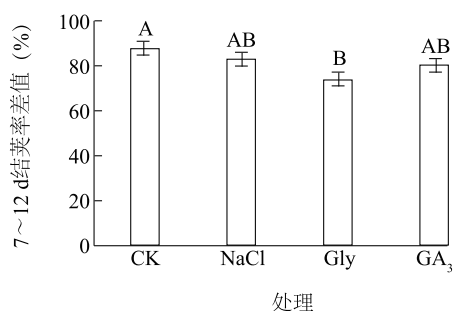




a: R1×W1; b: R4×W3; c: R5×W4; d: R6×W8; e: R8×W7; f: R9×W9; g: R10×W9。不同大写字母表示组合间差异达 0.01 显著水平。

图1 萝卜和芜菁杂交组合授粉后 7~21 d 结荚率差值

Fig.1 Difference of podding rate between day 7 and day 21 among different cross combinations of *R. sativus* × *B. rapa* L. ssp. *rapa*



各处理见表 2 注。不同大写字母表示组合间差异达 0.1 显著水平。

图2 萝卜和芜菁杂交组合不同处理授粉后 7~21 d 结荚率差值

Fig.2 Difference of podding rate between day 7 and day 21 of cross combinations of *R. sativus* × *B. rapa* L. ssp. *rapa* with different treatments

## 2.2 萝卜和芜菁属间杂交种子的获得

7 个杂交组合的部分处理获得少量种子,表 3 中仅列出最终获得种子的组合和处理。由表 3 可以看出,结籽率最高的为组合 R5×W4 的 GA<sub>3</sub> 处理,结籽率为 25.66%;其次是组合 R8×W7 的 NaCl 处理,结籽率为 5.44%。其他组合不同处理的结籽率均较低。包括对照在内的 3 种处理均获得种子的组合为 R4×W3、R8×W7、R9×W9,有 2 种处理获得种子的组合为 R10×W9,只有 1 种处理获得种子的组合为 R1×W1、R5×W4、R6×W8。在组合 R4×W3、R8×W7、R9×W9 中对照都获得了种子,在组合 R4×W3、R8×W7 中 NaCl 处理均获得了种子,在组合 R4×W3、R6×W8、R9×W9、R10×W9 中 Gly 处理都获得了种子,在组合 R1×W1、R5×W4、R8×W7、R9×W9、R10×W9 中 GA<sub>3</sub> 处理均获得

了种子。在获得种子的处理中,GA<sub>3</sub> 处理的组合数量最多且结籽率最高。统计分析结果显示,杂交组合间以及处理间结籽率差异不显著,说明本试验涉及的组合间杂交亲和性相差不大。

## 2.3 萝卜和芜菁属杂交种的形态学和细胞学鉴定

本试验一共授粉了 5 254 朵花(表 2),由于杂交的不亲和性,种荚败育,最终获得了 74 粒种子,但这些种子的饱满度很差,使用组织培养的方式进行培养,最终只有 4 粒种子发芽成苗(表 3)。经过形态学和细胞学鉴定,确定用 Gly 处理的组合 R9×W9,获得 1 株属间杂种苗,杂种获得频率为 0.40%。以获得杂种种子数和父母本全部染色体结合的杂种植株统计,总计授粉花数为 2 965 朵,结籽数为 74 株,结籽率为 2.5%,获得父母本全部染色体结合的杂种 1 株,杂种获得频率仅为 0.03%(表 3)。

母本萝卜种子形状为扁圆型,父本芜菁种子形状为圆球型,萝卜种子体积比芜菁种子大(图 3)。萝卜和芜菁杂交所获得的种子,大多数饱满程度差或者干扁,这可能是由于胚或胚乳败育引起的。大多数杂交种子的形状偏扁圆型,即偏母本,只有组合 R9×W9 的杂种 F<sub>1</sub> 种子形态为圆球型,与父本芜菁类似。

对 4 株杂种苗进行生根和驯化培养,然后定植到六合基地试验大棚中,进行形态学性状观察。观察发现,有 3 株杂种苗的叶片、花器形态都倾向于母本萝卜,没有表现出中间性状或带有父本性状的特征,初步判定这些植株在形态上属于偏母本植株。只有 1 株来源于组合 R9×W9 的杂种 F<sub>1</sub>,表现出父本芜菁的部分特征:母本萝卜 R9 的花色为白色,边缘粉色,花瓣的长宽比较芜菁的大;萝卜×芜菁杂种 F<sub>1</sub> 同母本萝卜花色相似为白色,花瓣边缘浅粉色,但是花型与父本相似,花瓣的长宽比较母本萝卜小;父本芜菁 W9 的花色为黄色,花瓣的长宽比母本萝卜小。母本萝卜 R9 的根为红色,长圆筒型;杂种 F<sub>1</sub> 的根浅红色,根型畸形,与双亲根型均不相同;父本芜菁 W9 的根为红色,圆型。母本萝卜分枝性较弱,叶片宽大,板叶;杂种 F<sub>1</sub> 分枝性较母本弱,株高大于父、母本,且主茎节间较母本萝卜长,叶片稀疏,叶片较少且大,幼苗期叶型为羽状复叶,生长后期偏板叶;父本芜菁分枝性强,叶片较小,羽状复叶。结合表 4 的表型数据,组合 R9×W9 的杂种 F<sub>1</sub> 叶形、叶片大小、花色处于偏亲(母本)表现,花蕾大小介于双亲之间,而株高、花萼大小、花瓣大小、雄蕊长、雌蕊长表现出超亲优势;杂种 F<sub>1</sub> 植株有微量花粉,高度雄性不育。

表 3 萝卜与芜菁杂交结籽率和杂种获得频率

Table 3 The seed setting rates and probability of hybrids derived from *R. sativus* × *B. rapa* L. ssp. *rapa*

| 杂交组合   | 处理              | 授粉花数 | 结籽数 | 成苗数 | 杂种株数 | 结籽率 (%) | 杂种获得频率 (%) |
|--------|-----------------|------|-----|-----|------|---------|------------|
| R1×W1  | GA <sub>3</sub> | 199  | 4   | 0   | 0    | 2.01    | 0          |
| R4×W3  | CK              | 281  | 2   | 0   | 0    | 0.71    | 0          |
|        | NaCl            | 258  | 7   | 0   | 0    | 2.71    | 0          |
|        | Gly             | 246  | 3   | 0   | 0    | 1.22    | 0          |
| R5×W4  | GA <sub>3</sub> | 152  | 39  | 2   | 0    | 25.66   | 0          |
| R6×W8  | Gly             | 244  | 1   | 0   | 0    | 0.41    | 0          |
| R8×W7  | CK              | 161  | 1   | 1   | 0    | 0.62    | 0          |
|        | NaCl            | 147  | 8   | 0   | 0    | 5.44    | 0          |
|        | GA <sub>3</sub> | 209  | 2   | 0   | 0    | 0.96    | 0          |
| R9×W9  | CK              | 186  | 1   | 0   | 0    | 0.54    | 0          |
|        | Gly             | 251  | 1   | 1   | 1    | 0.40    | 0.40       |
|        | GA <sub>3</sub> | 218  | 1   | 0   | 0    | 0.46    | 0          |
| R10×W9 | Gly             | 186  | 1   | 0   | 0    | 0.54    | 0          |
|        | GA <sub>3</sub> | 227  | 3   | 0   | 0    | 1.32    | 0          |

各处理见表 2 注。



A、B、C、J 分别为母本萝卜 (R9) 的种子、花、根和植株形态, D、E、F、K 分别为萝卜芜菁属间杂种 F<sub>1</sub> 的种子、花、根和植株形态, G、H、I、L 分别为父本芜菁 (W9) 的种子、花、根和植株形态。

图 3 萝卜、芜菁亲本及其杂种 F<sub>1</sub> 的形态比较

Fig.3 Comparison of the morphological properties of radish and turnip and their intergeneric hybrids

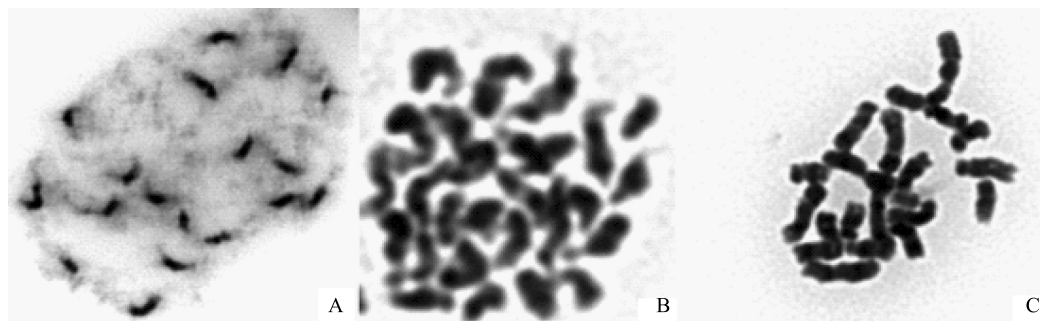
表 4 萝卜、芜菁亲本及其杂种 F<sub>1</sub> 的形态学特征

Table 4 The morphological properties of radish and turnip and their intergeneric hybrids

| 亲本及其杂种                  | 株高 (cm) | 叶形  | 叶片大小 (长×宽) (cm) | 花色 | 花蕾大小 (长×直径) (mm) | 花萼大小 (长×宽) (mm) | 花瓣大小 (长×宽) (mm) | 雄蕊长 (mm) | 雌蕊长 (mm) | 花粉有无 |
|-------------------------|---------|-----|-----------------|----|------------------|-----------------|-----------------|----------|----------|------|
| R9                      | 150     | 长卵形 | 25.27×12.97     | 白色 | 8.68×3.20        | 9.60×1.86       | 19.16×7.50      | 11.96    | 12.26    | 有    |
| W9                      | 145     | 长卵形 | 21.53×10.43     | 黄色 | 6.12×2.93        | 5.20×1.56       | 9.49×5.29       | 6.89     | 8.31     | 有    |
| R9×W9 杂种 F <sub>1</sub> | 220     | 卵形  | 21.13×16.03     | 白色 | 7.24×2.59        | 12.03×2.20      | 22.24×10.07     | 14.49    | 16.87    | 微量   |

通过对杂种株的细胞学鉴定(图4),发现其他3株杂种的染色体数与母本萝卜相同,因此,这些杂种后代不是父、母本全部染色体结合的远缘杂交后

代,为假杂种。而组合 R9×W9 的杂种  $F_1$  染色体数为  $3n=28$ ,推测杂种含有母本萝卜( $2n=18$ )的全套染色体及父本芜菁( $2n=20$ )的单套染色体。



A:萝卜亲本 R9; B:杂种  $F_1$ ; C:芜菁亲本 W9。

图4 萝卜、芜菁亲本及其杂种  $F_1$  的染色体数目

Fig.4 The chromosome number of radish and turnip parents and  $F_1$  hybrid

### 3 讨论

#### 3.1 萝卜与芜菁杂交的亲合性

从不同类型萝卜和芜菁材料远缘杂交的结荚率不同,可以发现不同亲本组合之间亲和性有差异,组合 R5×W4 的结荚率保持较好,在多数杂交组合中 Gly 处理对结荚率的保持具有较好的作用;然而从结籽率看,不同杂交组合和处理间差异不显著,说明结籽率与亲本基因型有关,不是单一因素决定的。孟金陵<sup>[39]</sup>在甘蓝型油菜与芥菜型油菜的远缘杂交中也发现亲本基因型分别控制受精指数高低及结实性强弱。不同组合和处理结荚率与结籽率不同的原因可能为:由于有些组合和处理虽然可以提高结荚率,但形成的大多是空荚;此外,由于本试验并没有对所有可能的杂交组合都进行组配,这也可能会导致试验结果有所偏差。

在试验中,有些组合的清水对照也获得了少量种子,说明亲本的亲和性较好,授粉前对母本柱头进行处理对杂交影响不大,在实际操作中,可以简化操作程序,不进行授粉前处理,加大授粉花朵数量,也可达到增加杂交种子数量的效果。本研究中,处理母本柱头溶液种类和浓度,参考了周芳菊<sup>[38]</sup>的试验,在后续研究中,对特定组合,还需要继续探究最合适的溶液种类及浓度。

#### 3.2 萝卜与芜菁杂种 $F_1$ 的形态学和细胞学鉴定

通过对杂种种子及植株形态的调查发现,真正

杂种株具有2个明显特征:种子形状和大小、花朵形态都与父本相似。刘忠松<sup>[40]</sup>认为偏母本植株可能是因染色体未减数配子结合或孤雌生殖产生的。孙万仓等<sup>[41]</sup>等认为偏母本植株可能是由异源花粉诱导的孤雌生殖所致。本研究通过染色体鉴定,发现偏母本株与母本具有相同的染色体数,因此不属于真正的远缘杂交后代。这些偏母本株产生的原因是雌配子自发加倍<sup>[42-43]</sup>、二倍体孤雌生殖<sup>[44-45]</sup>等。

本研究获得1株萝卜( $2n=18$ )与芜菁( $2n=20$ )的异缘三倍体属间杂种( $3n=28$ )。在芸薹属植物属间杂交时,其他属植物作母本常导致二倍体雌配子与单倍体雄配子结合<sup>[39]</sup>。因此,推测本研究获得的杂种染色体组成是源于母本萝卜的未减数雌配子与芜菁的雄配子。该杂种类似于双二倍体与亲本回交产生的回交一代。在本研究中,未获得源于萝卜和芜菁单套染色体的属间杂种( $2n=19$ ),可能是由于杂种获得频率太低,没有涵盖所有杂种类型;如果在早期使用胚胎拯救的方法,也许会提高杂种的获得频率。杂种株有微量花粉,自交后种荚膨大迅速,但未获得种子,这可能是由于减数分裂不正常所致,因此有必要进行染色体加倍以改良育性。

#### 参考文献:

- [1] BANNEROT H, BOULIDARD I, CAUDERON Y, et al. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*[J]. Proc Eucarpia Meeting Cruciferae Crop Section, 1974, 25:52-54.

- [2] BROWN G G, FORMANOVÁ N, JIN H, et al. The radish *Rfo* restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein wide multiple pentatricopeptide repeats[J]. The Plant Journal, 2003, 35(2): 262-272.
- [3] PETERKA H, BUDAHN H, SCHRADER O, et al. Transfer of resistance against the beet cyst nematode from radish (*Raphanus sativus*) to rape (*Brassica napus*) by monosomic chromosome addition[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(1): 30-41.
- [4] 潘大仁. 甘蓝型油菜与萝卜杂交产生的杂种 BC<sub>2</sub>代株系抗线虫病分析[J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(4): 402-406.
- [5] HAGIMORI M, NAGAOKA M, KATO N, et al. Production and characterization of somatic hybrids between the Japanese radish and cauliflower[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84:819-824.
- [6] KARPECHENKO G D. Polyploid hybrids of *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L.[J]. Molecular and General Genetics, 1928, 48(1): 1-85.
- [7] DOLSTRA O. Synthesis and fertility of *Brassicoraphanus* and ways of transferring *Raphanus* characters to *Brassica* [J]. Agricultural Research Reports, 1982, 917:1-9.
- [8] 娄丽娜, 刘哲, 苏小俊. 萝卜与芸薹属物种间的远缘杂交研究进展[J]. 江西农业学报, 2015, 27(9): 21-27.
- [9] MATSUZAWA Y, SARASHIMA M. Intergenic hybridization of *Eruca*, *Brassica* and *Raphanus*[J]. Cruciferae Newsl, 1986, 11: 17
- [10] SARSHIMA M, MATSUZAWA Y, KIMURA T. Intergenic hybridization between *Brassica oleracea* and *Raphanus sativus* by embryo culture[J]. Cruciferae Newsl, 1980, 10:25.
- [11] GUPTA S K. Production of interspecific and intergeneric hybrids in *Brassica* and *Raphanus*[J]. Cruciferae Newslett Eucarpia, 1997, 19: 21-22.
- [12] MCNAUGHTON I H. Synthesis and sterility of *Raphanobrassica* [J]. Euphytica, 1973, 22: 70-88.
- [13] KARPECHENKO G D. Hybrids of ♀ *Raphanus sativus* L. × ♂ *Brassica oleracea* L.[J]. Journal of Genetics, 1924, 14(3):375-396.
- [14] RHEE W Y, CHO Y H, PAEK K Y. Seed formation and phenotypic expression of intra and inter-specific hybridic hybrids of *Brassica* and of intergeneric hybrids obtained by crossing with *Raphanus*[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1997, 38: 353-360.
- [15] WARWICK S I, SIMARD M J, LEGERE A, et al. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives; *Brassica raps* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) OE Schulz[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(3):528-539.
- [16] PAULMANN W, RÖBBELEN G. Effective transfer of cytoplasmic male sterility from radish (*Raphanus sativus* L.) to rape (*Brassica napus* L.) [J]. Plant Breeding, 1988, 100(4): 299-309.
- [17] VOSS A, SNOWDON RJ, LÜHS W, et al. Intergeneric transfer of nematode resistance from *Raphanus sativus* into the *Brassica napus* genome[J]. Acta Hort, 2000, 539:129-134.
- [18] HONMA S H, HEECKT O. Investigations on F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> hybrids between *Brassica oleracea* var. acephala and *Raphanus sativus*[J]. Euphytica, 1962, 11:177-180.
- [19] HARBERD D J, MCARRITHUR E D. Meiotic analysis of some species and genus hybrids in the Brassicaceae[M] // TSUNODA S, HINATA K, GOMEZ C C. Brassica crops and wild allies. Biology and breeding. Tokyo: Japan Sci So Press, 1980: 65-87.
- [20] MIZUSHIMA U. Karyogenetic studies of species and genus hybrids in the tribe Brassicaceae of Cruciferae[J]. Tohoku Journal of Agricultural Research, 1949, 1:1-14.
- [21] LEE S S, WOO J G, SHIN H H. Obtaining intergeneric hybrid plant between *Brassica campestris* and *Raphanus sativus* through young ovule culture[J]. Korean Journal of Breeding, 1989, 21: 52-57.
- [22] LEE S S, CHOI W J, WOO J G. Development of a new vegetable crop in *Brassicoraphanus* by hybridization of *Brassica campestris* and *Raphanus sativus*[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 2002, 43:693-698.
- [23] KANEKO Y, MATSUZAWA Y, SARASHIMA M. Breeding of the chromosome addition lines of radish with single kale chromosome [J]. Japanese Journal of Breeding, 1987, 37(4):438-452.
- [24] FUKUSHIMA E, 福島, 榮二. Cytogenetic studies on *Brassica* and *Raphanus*[J]. Journal of the Department of Agriculture Kyush Imperial University, 1945, 7: 281-396.
- [25] TAKESHITA M, KATO M, OKUMASU S. Application of ovule culture to the production of intergeneric or interspecific hybrids in *Brassica* and *Raphanus*[J]. Japanese Journal of Genetics, 1980, 55(5):373-387.
- [26] TOKUMASU S. The increase of seed fertility of *Brassicoraphanus* through cytological irregularity[J]. Euphytica, 1976, 25: 463-47.
- [27] WANG Y P, SONNTAG K, RUDLOFF E, et al. Production and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus*[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2006, 86: 279-283.
- [28] SUN J L, LEE S S, BANG J W. Karyotype and genomic in situ hybridization pattern in *Brassicoraphanus*, an intergeneric hybrid between *Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* and *Raphanus sativus* [J]. Plant Biotechnol Rep, 2012, 6:107-112.
- [29] KOLTE S J, BORDOLOI D K, AWASTHI R P. The search for resistance to major diseases of rapeseed and mustard in India[C]//McGREGOR D I. Proceedings of the 8th international rapeseed congress, Saskatoon, Canada: Organizing Committee, 1991: 219-225.
- [30] LELIVELT C L C, KRENS F A. Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) into the *Brassica napus* L. gene pool through intergeneric somatic hybridization with *Raphanus sativus* L.[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 83:887-894.
- [31] THIERFELDER A, HACKENBERG E, NICHTERLEIN K, et al.



- Development of nematode-resistant rapeseed genotypes via interspecific hybridization[C]//McGREGOR D I. Proceedings of the 8th international rapeseed congress, Saskatoon, Canada: Organizing Committee, 1991:269-273.
- [32] LONG M H, XING G M, OKUBO H, et al. Cross compatibility between *Brassicoraphanus* (*Brassica oleracea* × *Raphanus sativus*) and cruciferous crops, and rescuing the hybrid embryos through ovary and embryo culture[J]. Journal of the Faculty of Agriculture University, 1992, 37: 29-39.
- [33] 徐学忠, 胡靖锋, 杨红丽, 等. 抗根肿病大白菜新品种 CCR11242 的选育[J]. 山东农业科学, 2015, 47(5): 19-22.
- [34] OGURA H. Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds[J]. Wm B Eerdmans, 1927, 116(3): 1446-1459.
- [35] 梅时勇, 甘彩霞, 崔磊, 等. 一种萝卜与芜菁属间远缘杂交获得离体胚的方法: CN102210259A[P]. 2011-10-12.
- [36] 房相佑, 饭田大助. 萝卜与芸薹野生种间属间杂交的生产[J]. 谢国祿译. 育种科学, 1997, 43(3): 223-228.
- [37] LOU L, LOU Q, LI Z, et al. Production and characterization of intergeneric hybrids between turnip (*Brassica rapa* L. em Metza. Subsp. *rapa*) and radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2017, 220: 57-65.
- [38] 周芳菊. 芸薹属与萝卜属间杂种的获得及 SSR 分子鉴定[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.
- [39] 孟金陵. 芸薹属植物属间杂交不亲和性研究进展[J]. 中国油料, 1987(4): 71-77.
- [40] 刘忠松. 油菜远缘杂交遗传育种研究进展[J]. 作物研究, 1995, 9(增刊): 17-19.
- [41] 孙万仓, 官春云, 孟亚雄, 等. 芸芥(*Eruca sativa* Mill)与芸薹属(*Brassica* L.) 3 个油用种的属间杂交[J]. 作物学报, 2005, 31(1): 36-42.
- [42] MOHAMMAD A, SIKKA S M. Pseudogamy in *Brassica* [J]. Curr Sci, 1940, 9: 280-282.
- [43] OLSSON G. Species crosses within the genus *Brassica* [J]. Hereditas, 1960, 46(1/2): 171-223.
- [44] MACKAY G R. On the genetic status of maternals induced by pollination of *Brassica oleracea* with *B. campestris* L. [J]. Euphytica, 1972, 21(1): 71-77.
- [45] EENINK A H. Matromorphy in *Brassica oleracea* L. V. studies on quantitative characters of matromorphic plants and their progeny [J]. Euphytica, 1974, 23(3): 725-736.

(责任编辑: 张震林)