

生物技术在油菜遗传改良中的应用

王道杰 王 灏 李殿荣

(陕西省杂交油菜研究中心, 陕西大荔 715105)

摘 要 概要介绍了基因工程、分子标记等生物技术在油菜遗传改良方面的应用研究情况。包括利用基因工程改良油菜品质、增强抗性、进行杂种优势的利用;利用分子标记进行油菜品种鉴别、基因定位、遗传图谱的构建及杂种优势预测等。

关键词 油菜, 基因工程, 分子标记, 遗传改良

分类号 S188, S565.403.5

油菜作为人类主要的食用油及工业用油作物在世界范围内的种植面积逐年扩大,特别是油菜细胞质雄性不育材料的发现与利用,将油菜杂种优势利用及生产提高到了一个新的水平,对增加菜籽产量、改进菜油质量发挥了重要作用。生物技术的发展又为油菜遗传改良向更高、更深层次发展提供了新的技术体系,开拓了新的研究领域。近年来,生物技术已在油菜遗传改良领域中得到了广泛的研究与应用。

1 基因工程在油菜遗传改良中的应用

转基因植物研究始于 70 年代末 80 年代初,当时仅在少数植物种如烟草、马铃薯上由野生型 Ri 和 Ti 质粒转化的细胞再生出植物^[1]。现已建立了一些基因转移的成功方法。其中用于转基因油菜研究的有以下 3 种方法^[2]。①微注射法将目的外源基因经过剪切后制备成一定浓度的脱氧核糖核酸(DNA)溶液,装入一个带注射器的玻璃微针内,注入油菜胚状体和下胚轴等的细胞内,随着细胞发育,部分外源 DNA 可以随机地整合到油菜基因组中,经过适当方法筛选便获得转基因油菜。②聚乙二醇法和电击穿孔法。利用油菜原生质体具有整合和表达外源 DNA 的能力,把油菜组织细胞脱壁,通过聚乙二醇处理或者电场处理使细胞膜的透性增加,从而使外源 DNA 进入细胞,除了大部分 DNA 被细胞内酶降解以外,少部分 DNA 整合到油菜细胞基因组中,并且能够较稳定地遗传下去。③农杆菌 Ti 或 Ri 质粒介导的基因转移法。这是迄今植物基因工程中应用最多、最理想的方法。

在转基因油菜研究中主要使用的载体有中间载体与双元载体。1985 年 Horsch^[3]最早在油菜上获得转基因植株后,转基因油菜的应用研究,在油菜品质改良、提高产油量、杂种优势、抗病虫和抗除草剂上都相继取得了突破性进展^[4]。

1.1 用基因工程方法增强油菜抗性

将除草剂抗性引入农作物是增加对除草剂选择性及安全性的一条新途径。草甘磷(Glyphosate)是一种非选择性的广谱除草剂,它是通过抑制 EPSP 合成酶(5-Enolpyruv

收稿日期 1998-05-31

课题来源 陕西省自然科学基金资助项目, 98SM 26

作者简介 王道杰,男,1970 年生,助研

-shikimate-3-phosphate synthase) 的活性而阻断芳香族氨基酸的合成, 最终导致受试植物死亡。将 EPSP 合成酶的基因导入作物中, 当使用草甘磷时, 作物不受损害。目前加拿大已有两个抗草甘磷的转基因油菜品系 (HCN 92 由 Hoechst 提供, 17138-164 由 Monsanto 提供) 参加 1992~1994 年加拿大油菜品种联合试验^[5]。此外, 比利时植物遗传工程公司 (PGS) 和德国赫司特公司 (Hoechst) 的科学家们从吸水链霉菌中分离出了可钝化除草剂 Basta 的酶基因, 而 Basta 能影响杂草中谷氨酰胺合成酶通道, 阻碍杂草生长。而具有这种基因的作物在发生伤害之前就已钝化了 Basta。对耐 Basta 植株进行的田间试验证明了这种保护作用是有有效的^[5]。

培养抗虫植物是基因工程的另一个重要应用领域, 现在利用的抗虫基因主要是苏云金杆菌 (*B. thuringensis*) 毒素蛋白基因, 也称 *B. t* 毒蛋白基因。苏云金杆菌毒素蛋白是苏云金杆菌在形成芽孢时产生的一种蛋白, 这种毒蛋白对鳞翅目昆虫有特异的毒性作用, 而对其他生物无任何危害。1991 年, 柯农在《高技术报导》上报道苏联科学院植物生理研究所把 *B. t* 毒蛋白基因转入油菜, 并用卡那霉素 (Kan) 筛选出抗 Kan 的油菜苗^[1], 但是尚未经过 Southern blotting 分子杂交验证。1995 年法国将水稻中克隆的 Cysteing 蛋白抑制酶基因转到油菜中, 以期培育抗虫品种^[1]。

病毒病害一直是农业生产的一个大问题, 植物基因工程的产生与发展, 给病毒病的防治带来新的希望。1986 年, Powell-Abel 等首次通过基因工程手段将烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白基因转入烟草培养成株之后^[6], 抗病毒植物基因工程越来越受到人们重视。Paszkawaki 等 (1986) 将工程烟草花叶病毒的基因转入白菜型油菜^[7]。Herve C 将花椰菜花叶病毒外壳蛋白基因导入甘蓝型油菜后, 使转基因植株获得抗病性^[4]。法国从番茄中分离和克隆了几丁质降解酶 (Chitinase) 基因, 转入甘蓝型油菜后, 获得了抗菌核病等四种真菌病害的高世代材料^[1]。卢爱兰等^[8]将芜菁花叶病毒外壳蛋白基因转化到甘蓝型油菜中, 获得了不同程度抗 TuMV 的转基因油菜。

1.2 用基因工程方法提高油菜品质

过去 10 年间, 通过转基因技术修饰油料种子油, 特别是油菜油的应用已取得了很大进展。表 1 所列是近年来发展的品质性状得到改良的转基因油菜新品种^[8]。这里所列举的是修饰油和蛋白质的巨大范围, 多数迫切要求得到田间释放。除此之外, 据 Downey R K 报道, 利用基因操作技术, 导入了油脂合成的关键酶——丙酮酸激酶基因的重组油菜, 油脂量至少增加 2%^[1]。据 Krebbeers Stayton Altenbach 等报道^[7], 通过根癌农杆菌导入拟南芥和豌豆 2S 白蛋白基因和巴西坚果 (*Bertholletia excelsa*) 富含甲硫氨酸种子蛋白基因, 使转基因油菜蛋白质总量成倍增加, 甲硫氨酸和赖氨酸含量显著提高。这些初步的努力都是在研究一系列相互关联的代谢活动的基础上取得的。在今后 10 年, 为了使一些性状的遗传操作目标可行, 使控制种子油质量的酶特征化是很重要的, 最终, 有可能使任意脂肪酸的含量达到 90%, 并能精确地说明这种脂肪酸在种子油中的非饱和状态、环氧化作用或羟(基)化作用程度。

表 1 最近世界范围内研制的转基因油菜新品种^[9]

种子产品	工业产品	首次田间试验	研制情况
40% 硬脂酸 (18: 0)	人造奶油, 可可油	1994	* * *
40% 月桂酸 (12: 0)	去污剂	1994	* * *
60% 月桂酸 (12: 0)	去污剂	1996	* * *
80% 油酸 (18: 1△9)	食物, 润滑材料, 墨水	1995	* * *
伞形花油酸 (18: 1△6)	聚合物, 去污剂	1998(?)	* *
希蒙德木蜡 (C20, C22)	化妆品, 润滑材料	1996(?)	* *
40% 肉豆蔻酸酯 (14: 0)	去污剂, 肥皂, 劳保用品	1996	* *
90% 芥酸 (22: 1)	聚合物, 化妆品, 墨水, 药物	1998(?)	* *
蓖麻油酸 (18: 1-O H)	润滑材料, 塑料, 化妆品, 药物	1997(?)	* *
聚羟基丁酸 (PHB)	生物可降解塑料	1997(?)	* *
植酶酸	动物饲料	1994	* * *
工业酶	发酵, 造纸, 食物加工	1998(?)	*
新肽类	药物	1995	* * *

注: * 示关键基因已经克隆; * * 示已获得转基因植株; * * * 示正在进行大田试验; ? 表示预测时间

1.3 基因工程在油菜杂种优势上的利用

TA29是烟草花药绒毡层特异表达的启动子,将其转入油菜可以进行特异性表达,根据这一特性, Mariani C等将两个不同的核糖核酸酶基因即 RNaseT1基因和 Barnase基因分别与 TA29的启动子相连,并导入烟草、油菜中,得到了工程雄性不育株^[3]。Dennis M等、李胜国等也得到了类似的结果^[1]。Mariani C等认为,由于 TA29-RNase基因的特异表达,选择性地破坏了花药绒毡层的 RNA,造成花粉发育受阻,最终导致雄性不育^[10]。

通过反义 RNA技术可阻断与花粉、花药发育相关的基因表达,以获得雄性不育株。用葡聚糖酶基因的反义 RNA基因,可导致油菜和拟南芥雄性不育。

不少植物含有细胞质雄性不育基因,直接将它们分离出来,重新构建成新的嵌合基因,再导入可育植株中,可导致胞质雄性不育,油菜萝卜质不育的 DNA(l)与雄性不育有关^[10]。把这种 DNA(l)导入到油菜的线粒体或核基因组中,将导致胞质雄性不育。这种人工创造的质不育克服了萝卜质不育低温缺绿,雌性育性低及异常花形态等缺点,同时也保持了萝卜质不育的不育性稳定等优点^[10]。其次,用 DNA探针可检测到 DNA(l)克隆,而不必通过长期的育种工作来检测,这种工程质不育可直接用于杂种生产。

一般来讲,如果转化基因在基因工程植物雄性不育系材料中不是单基因显性表现时,那么作为保持系的正常植物作父本与工程雄性不育植物杂交的后代,将出现分离现象,一些植株雄性不育,一些植株则雄性可育。如何解决被保持的雄性不育材料的雄性不育一致性是应用于生产的关键环节。通过将雄性不育基因和抗除草剂基因串连在一起,并一同转入植物中这一途径,解决了这个难题。因为在转基因植物中,不育基因与抗除草剂基因是紧密连锁的,二者同时存在同时消失,可以通过施用除草剂有选择性地将雄性可育株杀死,将雄性不育株保留下来而得到保持。

对于以生产种子为目的的植物油菜,要得到用于生产的杂交种子,还必须恢复系。Mariani C等^[3]将 Barnase抑制剂 Barstar基因与烟草花药绒毡层特异启动子 TA29串联构成嵌合基因 TA29-Barstar导入油菜,得到 TA29-Barstar转基因油菜,这些油菜便是 TA29-Barnase转基因工程不育油菜的恢复系。TA29-Barstar转基因油菜雄性可育,花药

绒毡层发育良好,无任何不良表现。以 TA29-Barnase 转基因油菜作母本与 TA29-Barstar 转基因油菜杂交后代同时含有 TA29-Barnase 和 TA29-Barstar 两种基因,可恢复雄性可育。彭仁旺等^[11]用类似方法也得到了转 barnase 基因雄性不育油菜的恢复系转 Barstar 基因及 bar 基因的转基因油菜。这为应用基因手段创造植物不育系的相应恢复系开辟了道路。另外,利用反义 RNA 技术抑制雄性不育基因的表达,使转化株雄性可育,也能成为工程不育系的恢复系。

2 分子标记在油菜遗传改良中的应用

分子标记是以 DNA 分子等位区段存在核苷酸序列差异为基础,以与目的基因紧密连锁为前提的易于通过电泳检测、鉴别的一类遗传标记。就油菜而言,目前被广泛应用的分子标记体系有 RFLP, RAPD, SSR 和 AFLP 等。他们具有数量大,不受环境因素、组织发育阶段的影响,遗传稳定,具有显性或共显性等优点。近年来,这些分子标记技术已先后用于油菜亲缘关系和遗传距离分析、品种鉴别、遗传图谱构建和基因定位等方面,并获得重要进展^[12~14]。

2.1 油菜亲缘关系和遗传距离分析

油菜是十字花科芸苔属油用植物的总称。以往关于油菜的亲缘关系从细胞学、形态学、同工酶和化学组成等方面进行了大量研究,都证实了禹氏三角的正确。通过叶绿体 DNA 的分析弄清了 *B. juncea* 和 *B. carinata* 的细胞质供体种,但不清楚 *B. napus* 的细胞质供体种。Song 和 Osborn^[15]通过对大量材料的系统分析后认为 *B. napus* 细胞质有多种来源, Thormann 等^[12]通过对核 DNA 的 RFLP 和 RAPD 分析进一步证实了叶绿体 DNA RFLP 分析结果等确定的油菜亲缘关系。李汝刚等^[16]利用 15 个随机引物对 36 份芥菜型油菜的基因组 DNA 进行了 RAPD 分析,建立了 36 份芥菜型油菜的亲缘关系图。

遗传距离分析结果可以指导杂交育种和优势组合选配,因此近年来运用分子标记对各地的甘蓝型油菜种质进行了许多分析。德国 Forster J 利用 RFLP 和 RAPD 标记研究了 21 个冬油菜之间的遗传距离, Dier^[13]用 RFLP 标记研究了来自欧洲的 83 个甘蓝型油菜品种的遗传多样性,结果把甘蓝型油菜品种资源区分为三大类群,即冬油菜群、春油菜群和中国—日本群。孟金陵等^[17]对 59 个欧洲甘蓝型油菜品种(系)的 RFLP 标记进行了分析,表明甘蓝型油菜的多态性水平很高,品种间存在丰富的遗传变异。

2.2 图谱定位控制油菜重要性状的基因

在油菜上目前利用分子标记进行基因定位的性状,有植物学性状、品质性状和抗病性状等。利用 RAPD 标记对油菜不育恢复、亚麻酸含量、矮秆、根肿病抗性等多个性状基因进行了标记和定位^[18~20]。利用 RFLP 标记技术已对油菜的黄籽性状、含油量、芥酸含量、硫甙含量、黑胙病抗性、白锈病抗性等农艺和品质性状基因进行了标记和定位^[21~25]。这些基础研究结果为在油菜育种中有目的地操纵这些性状奠定了基础。

2.3 DNA 指纹库的应用

在同一物种的各个品种间存在大量的多态性 DNA 分子标记,某一品种所具有的独特标记即一些特异性 DNA 片段的组合称为该品种的“指纹”,各品种的独特指纹片段构成该物种的 DNA 指纹库。

DN A指纹库在植物育种中的应用范围非常广泛。根据种质资源 DN A指纹的多态性,可以对各种材料的变异丰富度作出综合评价。各品种的 DN A指纹差异可直接提供与目标性状有关的 DN A水平的信息,不受环境因素的影响,从而能大大提高杂交育种中对亲本及后代理想单株的选择效率。通过检测品种是否具有该品种特有的标记指纹片段,可以有效地鉴定品种纯度,以对种子质量进行检测。Mailer^[26]用 RAPD 方法鉴定了澳大利亚甘蓝型油菜所有栽培品种。Charters 等^[27]运用 5'-锚定 SSR 引物 (anchored SSR primer) 分析了 20 个甘蓝型油菜品种,两个引物共产生了 56 条多态性带纹,将 20 个品种一一区分开来。利用分子标记可以鉴定油菜品种的 DUS (Distinctness, Uniformity 和 Stability),从而为品种审定、保存、保护提供依据。

2.4 油菜的杂种优势预测

Diers 等^[28]用 RFLP 分析了 7 个甘蓝型油菜品种间及其衍生的自交系间的遗传距离,并以亲本间的遗传距离与用这些亲本配制的 F₁ 杂种产量作了相关分析。发现用 RFLP 分子标记所揭示的亲本间遗传距离愈远, F₁ 杂种的产量则愈高。

杂种优势来源于 DN A 的杂合性,分子标记第一次提供了准确判断杂交组合优势的 DN A 的手段,从而也第一次有可能从 DN A 水平上预测杂种优势。利用分子标记,还可以人工培育出 DN A 序列重要片段用以培育高度杂合的亲本,从而配制出超优势的 F₁ 组合。

生物技术的内容远不止上述这些方面,还包括组织培养、体细胞杂交等内容,这些技术起步较早,在各种作物上已广泛应用,并走向实用性阶段。

参 考 文 献

- 1 官春云,李 旬.转基因油菜应用研究.细胞生物学杂志,1997,19(1): 18~ 23
- 2 周延清.转基因油菜研究进展.生物学报,1991,29(5): 3~ 4
- 3 朱玉贤,李 毅.现代分子生物学.北京:高等教育出版社,1998. 435~ 448
- 4 Don Grierson. Plant genetic engineering. Chapman and Hall, 1991. 6~ 8
- 5 Law C M. Genetic manipulation in plant breeding—prospects and limitation. Euphytica, 1995, 35: 1~ 12
- 6 Charrles S, Gasser T, Robert T. Genetically engineering plants for crop improvement. Fraley in Science, 1989, 244 (16): 1293~ 1299
- 7 Shain D K, Charles J A. Plant biotechnology. Butterworth Publishers, 1989. 5~ 48
- 8 卢爱兰,陈正华,孔令浩,等.抗芜菁花叶病毒转基因甘蓝型油菜的研究.遗传学报,1996,23(1): 77~ 83
- 9 Murphy D L. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. Trends Biotechnol, 1996, 14(6): 206~ 213
- 10 钟 蓉,刘玉乐,罗 鹏,等.植物杂种优势利用的基因工程研究进展.生物技术通报,1996(1): 1~ 5
- 11 彭仁旺,周雪荣,王峻岭,等.表达 barstar 基因及 bar 基因的转基因油菜的研究.遗传学报,1998,25(1): 74~ 79
- 12 Thormann C E, Ferreira M E, Camargo L E A, et al. Comparison of genetic relationship estimates within and among cruciferous species based on RFLP and RAPD markers. Theor Appl Genet, 1994, 88: 973~ 980
- 13 Diers B W. Genetic diversit of oilseed *Brassica napus* germ plasm based on RFLP. Theor Appl Genet, 1994, 87 (6~ 7): 662~ 668
- 14 Diedenichsen E, Sacristan M D. Disease response of resynthesized *B. napus* L. lines carrying different combinations of resistance to plasmodiophora brassicae wor. Plant Breeding, 1996, 115(1): 5~ 10
- 15 Song K, Osborn T C. Polyphyletic origins of *B. napus* new evidence based on organelle and nuclear RFLP analysis. Genome, 1992, 35: 992~ 1001

- 16 李汝刚, 朱 莉, 伍宁丰, 等. 我国芥菜型油菜品种遗传多样性初探. 生物技术通报, 1997(5): 26~ 31
- 17 孟金陵, Sharpe A, Bowman C, 等. 用 RFLP 标记分析甘蓝型油菜的遗传多样性. 遗传学报, 1996, 23(4): 293~ 306
- 18 Delourme R, Bouchereau A. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the ogura radish CMS or rapeseed. Theor Appl Genet, 1994, 88(6~ 7): 741~ 748
- 19 Tanhuanpaa P K. Association of a RAPD marker with Linoleic acid concentration in the seed oil of rapeseed. Genome, 1995, 38(2): 414~ 416
- 20 Foisset N, Delourme R, Barret P, et al. Molecular tagging of the dwarf *BREIZH* (B2h) gene in *Brassica napus*. Theor Appl Genet, 1995, 91(5): 756~ 761
- 21 VanDeynze A E, Landry B S, Pauls K P. The identification of RFLP linked to seed colour genes in *B. napus*. Genome, 1995, 38(3): 534~ 542
- 22 Ecke W, Wunova M, Weissleder K. Mapping the genome of rapeseed 2. localization of genes controlling erucic acid synthesis and seed oil content. Theor Appl Genet, 1995, 91(6~ 7): 972~ 977
- 23 Toroser D, Thorman C E, Osborn T C, et al. RFLP Mapping of quantitative trait loci controlling seed aliphatic glucosinolate content in oilseed rape. Theor Appl Genet, 1995, 91(5): 802~ 808
- 24 Ferreira M E, Rimmer S R. Mapping loci controlling *B. napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. Phytopathology, 1995, 85(2): 213~ 217
- 25 Ferreira M E, Williams P H. Mapping of a locus controlling resistance to *Albugo candida* in *B. napus* using molecular marker. Phytopathology, 1995, 85(2): 218~ 220
- 26 Mailer R T, Scarth R, Fristensky B. Discrimination among cultivars of rapeseed using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. Theor Appl Genet, 1994, 87: 697~ 704
- 27 Charters Y M, Robertson A, Wilkinson M J, et al. PCR analysis of oilseed rape cultivars using 5' anchored SSR primers. Theor Appl Genet, 1996, 92(4): 442~ 447
- 28 Diers B W, Mevett P B E, Osborn T C. Relationship between heterosis and genetic distance based on RFLP marker in oilseed rape. Crop Science, 1996, 36(1): 79~ 83

Utilization of Biotechnology in Genetic Improvement of Rapeseed

Wang Daojie Wang Hao

(Hybrid Rapeseed Research Center of Shaanxi Province, Xuzhuang, Dali 715105)

Abstract This paper briefly introduces the utilization and research of biotechnology such as gene engineering, molecular markers and so on in genetic improvement of rapeseed. Gene engineering has been widely used in the improvement of rape quality, increase of rape resistance and heterosis of rapeseed. The technology of molecular markers can be used for the distinction of rape varieties, location of genes, construction of genetic atlas and prediction of heterosis.

Key word rapeseed, gene engineering, molecular marker, genetic improvement