

油菜遗传育种研究进展

官春云

(湖南农业大学农学系, 长沙 410128)

[摘要] 介绍油菜品质育种, 油菜小孢子培养和双单倍体育种, 油菜基因工程, 油菜杂种优势利用等研究进展情况。

[关键词] 油菜, 遗传, 育种

油菜遗传育种是本世纪20年代后期开展起来的, 40—50年代, 欧洲各国和亚洲的日本居世界领先地位, 主要是在细胞遗传学研究和新品种选育方面成绩突出。60—70年代, 加拿大和欧洲各国居世界领先地位, 主要是在优质油菜遗传育种方面成绩突出。80年代以来, 我国在杂交油菜育种方面成绩突出, 而美、加和欧洲各国在生物技术方面发展很快。据不完全统计, 几十年来各国育成了适于不同生态条件和耕作制度的品种1000多个。中国、德国、加拿大等国是育成品种较多的国家。我国从50年代以来育成的品种共约200多个。

1 油菜品质育种

1.1 将优质与高产抗病等性状结合起来

原有油菜品种芥酸含量在40%以上, 饼粕中硫代葡萄糖苷含量为110—150 $\mu\text{mol/g}$, 严重影响菜油和饼粕营养品质。自50年代后期和60年代后期分别发现低芥酸和低硫代葡萄糖苷品种资源后, 各国相继育成了一批单低(芥酸含量5%以下)和双低(芥酸含量5%以下, 硫代葡萄糖苷30 $\mu\text{mol/g}$ 以下)的油菜品种^[1]。由于最初发现的低硫代葡萄糖苷油菜基因资源Bronowski农艺性状差, 因此开始育成的双低油菜品种产量不高。为此, 各国利用丰产抗病品种与之连续回交, 或进行复式杂交, 育成了一批优良品种。如加拿大育成的Regent (1977), Westar (1982), Legend (1988)等品种, 产量一个比一个高, 抗性也一个比一个好^[2]。

与此同时, 各国还创造了很多具有新脂肪酸组成的油菜品种, 如低亚麻酸(3.3%)品种Stellar (Stefansson B. R., 1988), 高棕榈酸(12%)品系(Jonsson R., 1983), 以及高亚油酸(30%)低亚麻酸(1.8%)品系Nzelenenic (Roy N. N., 1986)等。通过油菜品质育种, 油菜脂肪酸的组成已经发生了很大变化(表1)。

我国油菜品质育种是80年代初期开展起来的, 并且一开始就把优质和丰产抗病性状结合起来, 至1994年已育成单、双低油菜品种30多个, 种植面积达100多万 hm^2 。目前唯一通过国家审定的双低油菜品种是官春云等(1987)育成的湘油11号, 该品种比推广品种增产10%以上, 累计推广面积超过66万 hm^2 。

本文于1994年11月28日收到。

表1 甘蓝型油菜和白菜型油菜脂肪酸组成范围

脂 肪 酸	原来品种 ¹⁾		现有品种 ²⁾	
	最小值%	最大值%	最小值%	最大值%
棕榈酸 (16:0)	2	4	2.8	10.0
硬脂酸 (18:0)	—	—	0.4	2.8
油 酸 (18:1)	8	23	9.8	78.0
亚油酸 (18:2)	11	18	9.3	35.5
亚麻酸 (18:3)	6	12	3.9	21.8
花生烯酸 (20:1)	3	14	0.0	16.0
芥酸 (22:1)	41	47	0.0	61.0

1) 根据 Appelqvist L. A. (1977)资料整理;2)根据 Downey R. K. (1987)资料。

1.2 利用基因工程提高油菜品质

据 Davies 等 (1992) 报道, 在脂肪酸代谢过程中催化不饱和反应的酶为质体中的 18 碳酰基载体蛋白脱氢酶 (stearoyl-ACP desaturase)。将其反义 RNA 基因导入油菜和芜菁, 结果使转基因植物中饱和的 18 碳烷酸含量由 2% 提高到 40%, 增加 20 倍, 但油脂含量仅为正常种子的一半。另据 Knutzon 等报道, 由加州月桂树 (Califokniabay) 分离得到的月桂酰基载体蛋白硫酯酶基因导入油菜后, 使转基因油菜种子油中月桂酸 (12 碳饱和脂肪酸) 含量高达 50%^[3]。此外据 Krebbeors 等 (1991), Stayton 等 (1991), Altenbach 等 (1992) 报道, 通过根瘤杆菌导入拟南芥和豌豆 2S 白蛋白基因和巴西坚果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。这些事实都说明, 通过基因工程改良种子中油脂和蛋白质组成是可能的。

1.3 甘蓝型油菜黄色种皮育种

油菜黄色种皮厚度仅为黑色种皮厚度的 2/3 左右, 这样, 黄色种皮油菜种子含油量和蛋白质含量就相对较高, 而纤维素相对较低, 而且饼粕和油的色泽好。所以, 油菜黄色种皮育种也是品质育种的重要内容。由于甘蓝型油菜本来没有黄籽类型, 因此研究十分重要。1979 年, 刘后利从甘蓝型油菜和白菜型油菜种间杂种华油 3 号的 13 代群体中发现黄籽株系。经遗传研究, 认为种皮颜色受三对基因控制, 黑色种皮为显性, 但粒色遗传很不稳定。另据王汉中等 (1990) 研究, 多酚氧化酶在黑籽呈色过程中起重要作用。多酚化合物是多酚氧化酶的底物, 反式苯丙烯酸是多酚化合物和花色素生物合成的共同前体物质, 而反式苯丙烯酸的合成受苯丙酸解氨酶 (PAL) 所直接催化。经测定, 甘蓝型油菜黄色种皮中的 PAL 酶活性明显低于黑籽, 但与白菜型油菜相比, 仍是较高的, 值得进一步研究。1985 年, 刘后利等育成了世界上第一个黄色种皮甘蓝型油菜品种华黄 1 号, 其亲本组合为 75-33×宜宾 38-1。该品种黄籽频率达 95% 以上, 出油率比黑籽品种高 5—8 个百分点^[4]。

2 油菜小孢子培养和双单倍体育种

小孢子是指未成熟的花粉细胞。油菜小孢子培养是将油菜单核期花粉进行培养, 促进其细胞分裂, 形成单倍体胚, 并进而诱发单倍体植株, 再经染色体加倍形成同质结合的二倍体植株, 即双单倍体。这一育种方法最大的好处是能缩短育种时间和提高育种效率。Siebel J. 和 Panls K. P. (1988) 认为, 小孢子培养可以获得完整的遗传变异后代, 而且不同遗传型的个

体数较少, 其表现型不因基因的显性效应而复杂化, 而对隐性基因决定的性状的选择则更为有效。如甘蓝型油菜低芥酸含量受两对隐性基因控制, 低硫代葡萄糖苷含量受三对隐性基因控制, 黄色种皮受三对隐性基因控制。现若用一个高芥酸、高硫代葡萄糖苷、黑色种皮品种与一个低芥酸、低硫代葡萄糖苷的黄色种皮品种杂交, 在通常杂交 F_2 群体中, 要在6.5 536万株中才可获得1株低芥酸、低硫代葡萄糖苷和黄色种皮的后代, 而在小孢子培养形成的双单倍体中仅从256株中即可选得1株。

油菜小孢子培养的研究已进行多年, 用于双单倍体育种还是近几年的事。

2.1 小孢子培养和加倍技术研究取得进展

通过对供体植株、小孢子分离、培养基和培养条件、染色体加倍、小植株栽培等一系列研究, 加拿大圭尔夫大学 Coventry J. 等(1988)已建立甘蓝型油菜小孢子培养技术规程, 即首先将小孢子悬浮在NLN液体培养基中, 在30℃培养箱中培养14天, 再放在黑暗条件下, 转速为60的摇床上培养7天, 然后将幼胚转移到B5固体培养基上培养, 即可获得单倍体小植株^[5], 经加倍后获得双二倍体植株。Swanson E. B. (1990)也提出了*Brassica*属植物小孢子培养方法。油菜每花药中通常有小孢子1.5万个左右, 现在一般每花药胚产量为20—30个, 但高的每花药胚产量已达1300个(Kott L. S. 等, 1988)。

2.2 双单倍体育种已取得成效

丹麦Cyclone是世界上第一个用小孢子培养和双单倍体育种育成的品种。1994年又有加拿大阿尔伯达大学育成的91~21864。国内陈之征等(1990), 李桐(1994), 余凤群(1994)等均有育成双单倍体株系的报道^[6]。此外, 利用小孢子培养选择压选育具有一定抗性的材料也取得进展。如Beverdof(1988), Swanson(1989)等利用 γ 射线或叠氮化钠处理, 获得抗除草剂绿磺隆(Chlorosulphuron)和草甘磷(Glyphosate)的植株; Cloutier和Pauls(1991)以低温作为选择压(-10℃, -15℃, -20℃)得到了耐低温材料; 我国利用草酸作为选择压筛选抗菌核病的材料等。

2.3 直接以小孢子作为外源基因的受体, 转化小孢子后进行培养, 产生胚状体

这一方法可大大减少转化后形成嵌合体的可能性。Neuhans G. 等(1987)用含NPT II基因结构的DNA微注射胚状体, 8周内得到大量再生植株, 通过DNA点分析, 转化效率为27%—51%。陈军以小孢子为受体, 通过根癌农杆菌介导法转移芜菁花叶病毒外壳蛋白基因, 未获成功, 但用激光微束穿刺法转移同样的基因, 已得到1株转基因小苗^[7]。

3 油菜基因工程

近年来, 油菜基因工程研究蓬勃开展, 特别是加拿大, 至1992年加全国转基因植物试验共205个, 其中油菜为164个。在这164个试验中, 抗除草剂的试验为159个, 抗病试验1个, 改变蛋白质试验1个, 提高含油量的试验1个^[8]。

3.1 抗除草剂基因工程

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-Enolpyruvylshikimate-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。目前已从*E. coli*中分离出一个突变株, 它含有抗草甘磷的EPSP合成酶的突变基因, 将其引入到作物中, 当使用草甘磷时, 作物不受损害。又由于草甘磷无毒, 无残留, 易

分解,不污染环境,因此人们对抗草甘磷的 EPSP 合成酶基因的遗传操作十分重视。目前加拿大已有两个抗草甘磷的转基因油菜品种系(HCN92,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,这些品种系在产量方面与当前品种相当,但品质和抗性加强。

3.2 抗虫基因工程

现在利用的主要是苏云金杆菌(*B. thuringensis*)毒蛋白基因,也称 BT-毒蛋白基因。苏云金杆菌毒蛋白是苏云金杆菌在形成芽孢时产生的一种蛋白,以结晶形式出现,被称为伴孢晶体。这种毒蛋白对鳞翅目昆虫有特异的毒性作用,而对其它生物则无任何危害。这个基因是由苏云金杆菌内的一个大型质粒编码的。据报道,俄罗斯科学院植物生理研究所已利用农杆菌二元载体系统对油菜进行遗传转化,把苏云金杆菌毒蛋白基因转入油菜,并用卡那霉素筛选出抗卡那霉素的油菜苗,但是未经过 Southern blotting 分子杂交验证(高技术报道,1991)。另据华学军等(1992)报道,他们利用二元载体系统,通过土壤根瘤农杆菌 A281 和 B6S3 菌株的介导,将 *B. t. aizawai* 7-29 毒蛋白基因导入花椰菜品种中,得到了转基因愈伤组织及其再生植株, Southern 分子杂交证明 BT-毒蛋白基因已整合到了花椰菜基因组中^[9]。

3.3 抗病毒基因工程

将植物病毒的外壳蛋白基因转移到植物中,获得抗病毒的转基因植物,是由 Abel 等人(1986)首次在烟草上获得成功的。据 Paszkawaki 等报道(1986),他们用微注射法已将工程烟草花叶病毒的基因转入白菜型油菜的原生质体,并获得了转基因油菜。

4 油菜杂种优势利用

杂种比亲本品种一般增产 15% 以上,好的组合可增产 30%,甚至 50% 以上。因此油菜杂种优势利用受到各国重视。我国杂种油菜选育和生产应用居世界领先地位,至 1993 年已育成杂种油菜品种 12 个,杂种油菜种植面积占全国油菜总面积的四分之一。

4.1 三系杂种优势利用

70 年代后期以来,在油菜中发现了多个不育胞质,其中较好的有 Nap cms 系统(Thompson, 1972; 志贺敏夫, 1973), Ogu cms 系统(Ogura, 1968), Pol cms 系统(傅廷栋, 1972)等。Pol 不育系来自甘蓝型油菜品种 Polima 中天然不育株。1976 年崔德诉等首先实现三系配套,1985 年和 1990 年付廷栋又分别实现低芥酸和双低 Polima 三系配套。目前加拿大育成的杂种油菜 Hyola40, Hyola401 也是利用 Pol 雄性不育细胞质。我国目前栽培面积最大的三系杂种是李殿荣育成的(1985)秦油 2 号(*B. napus*),其杂种核基因(rfRf)为欧亚变种间杂合基因。由于亲本血缘关系较远,品种间差异较大,因此它具有较强的杂种优势^[10]。

关于油菜雄性不育的分子基础,很多研究表明,正常品系与雄性不育品系主要在 mtDNA 上存在差别^[11]。而孙威等研究表明,与油菜叶绿体基因组有关,并进行了叶绿体基因组雄性不育特异 DNA 片段的定位^[12]。

4.2 自交不亲和系及杂种优势利用

油菜属孢子体型自交不亲和系统。近年来对油菜自交不亲和性的分子基础有一些研究。1985 年, Nasrallah J. B. 证明,不同 S 位点的复等位基因柱头提取液中产生的糖蛋白质的迁移率不同,而且这种糖蛋白质只在柱头上发现,在花柱和幼芽组织中均没有。在此基础上,他

提出了具有自交不亲和性柱头 poly A+RNA 构建的 cDNA 文库中, 一定包括有 S-位点-特异性-糖蛋白质 (简称 SLSG, 即 S-locus-specific-glycoproteins) 序列的原理, 首次从 *B. oleracea* 2000 独立 cDNA 克隆中筛选出 8 个含有 SLSG 序列的克隆。然后用 BamHI 消化插入到 PBO₅ 载体中, 并对它进行了序列分析。South blotting 分析表明, 限制性片段大小的多样性特异于不同的基因型, 证明了 cDNA 编码一个与 S 基因有关的蛋白。West blotting 结果表明编码 SLSG DNA 序列在载体上已表达。1987 年 Takayana 等从白菜型油菜中提取 SLSG, 并且分离出组成糖蛋白质的多肽。肽链的序列分析表明, 同为芸苔属的 *B. campestris* 与 Nasrallah 克隆的 *B. oleracea* 的序列相比, S 基因糖蛋白质 (SLSG) 在两个物种中的氨基酸序列有 80% 的同源性。McClure B. A. 等研究表明, 控制自交不亲和的 S-糖蛋白质即为 RNase^[13]。

目前很多国家都在利用油菜自交不亲和系生产杂种, 如加拿大 King Agro 公司育成的 HC-120, 比当地推广品种 Westar 增产 10% 以上, 通过了国家品种登记。我国华中农业大学从 70 年代中期起也曾育成 211 和 271 等自交不亲和系并生产杂种大面积种植。

4.3 化学杀雄及杂种优势利用

Kaul M. 曾归纳植物化学杀雄的研究, 认为当今世界各国用于芸苔属植物上的有三种较好的化学杀雄剂 (表 4)^[14]。从表 4 可以看出, 适于在甘蓝型油菜上应用的化学杀雄剂是 ZMA。据官春云等研究, 采用 0.03% 有效浓度的 ZMA, 在单核期喷 1—2 次, 即可导致 80% 左右的雄性不育株。1993—1994 年, 官春云与 Stringam 研究了 ZMA 在白菜型油菜上的应用效果, 结果表明, 用 0.02% 有效浓度在单核期和 7d 后各喷 1 次, 可导致 80% 以上的不育株。我国是世界上最早而且最大面积种植油菜化学杀雄杂种的国家, 80 年代初期已用于生产。现已审定或鉴定的品种有湘杂油 1 号、蜀杂 2 号、涪优 1 号等, 栽培面积 100 多万 hm²。

表 4 用于芸苔属植物的主要化学杀雄剂

物种 (化学杀雄剂)	研究者 (年)	诱导雄性不育率	雌蕊结实
<i>B. juncea</i> (Ethrel)	Banga 和 Labana (1984)	高	高
<i>B. napus</i> (ZMA)	Guan C. Y. (1979)	高	很高
<i>B. oleracea</i> (GA)	Meer 和 Van Dam (1979)	有变异	—

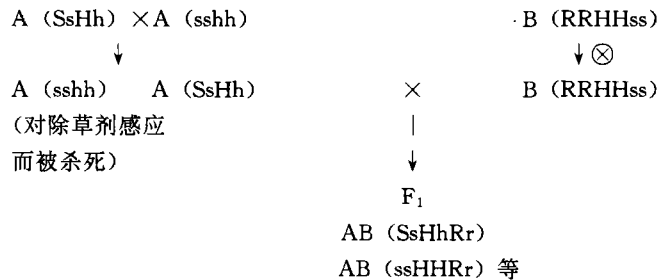
4.4 TA29 基因及转基因杂种油菜

TA29 核酸酶基因最先是由 Goldberg R. B. 在烟草花器中发现的^[15]。这一基因转至油菜等作物中可以表达。据 Mariani C. 等研究, 外源的 TA29 核酸酶基因在绒毡层中专一表达时, 致使绒毡层细胞败育, 而绒毡层细胞主要是为花粉粒发育提供营养的, 败育后导致花粉发育不正常而表现为雄性不育^[16]。进而, 为了达到育性的恢复, Mariani C. 又设计了用绒毡层专一启动子与 TA29 核酸抑制物基因构成融合基因导入植物, 与上述导入 TA29 核酸酶基因后得到的雄性不育株杂交, 在 F₁ 代中由于 TA29 核酸抑制物基因表达, 抑制了 TA29 核酸酶的活性, 从而恢复可育^[17]。

为了使基因工程雄性不育系可保持下去, Mariani C. 又设计了将 TA29 核酸酶基因与 bar 基因 (编码抗除草剂磷化麦黄酮的 PPT 乙酰转移酶) 串联在一起的转化植物。这一转基因雄性不育植物当与正常油菜杂交时产生的后代即可用除草剂处理, 选择性杀死可育株而保留不育株。现在比利时 PGS 公司 (1993) 已利用这套材料生产杂种。现将 PGS 杂种系统生产过

程图示如下:

- A系 遗传型的雄性不育系 (具有S显性不育基因, 且抗除草剂的H基因与S基因紧密连锁)
 A系 保持系 (雄性可育)
 B系 恢复系 (具有显性基因R+H, 雄性可育)



据报道, 目前这一转基因杂种油菜已进入田间试验。这一方法的建立为油菜等作物三系育种提供了新的有效途径, 其应用前景是极其可观的。

参 考 文 献

- [1] 中国农业科学院油料作物研究所主编. 中国油菜栽培学, 北京: 农业出版社, 1990. 192—214.
 [2] 官春云. 加拿大油菜品种的演变及现状. 中国油料, 1994, 16 (4): 74—79.
 [3] Knutzon D S *et al.* Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89 (7): 2624—2628.
 [4] 刘后利. 甘蓝型黄籽油菜的遗传研究. 作物学报, 1992, 18 (4): 241—249.
 [5] Conventry J *et al.* Manual for microspore culture technique for *Brassica napus*. University of Guelph, OAC Publication 0489 (1988).
 [6] 李 桐. 油菜小孢子培养和双单倍体育种. 作物研究, 1994, 3: 1—5.
 [7] 陈 军, 陈正华, 刘澄清. 中加油菜育种项目年会暨学术讨论会论文集, 新疆乌鲁木齐: 农业部科技司、新疆农业科学院出版, 1994. 60—71.
 [8] Brewster Kneen. The rape of canola. New Canada Publications, 1992. 211—212.
 [9] 华学军, 陈晓邦, 范云六. *Bacillus thuringiensis* 杀虫基因在花椰菜愈伤组织的整合与表达. 中国农业科学, 1992, 25 (4): 82—86.
 [10] 李殿荣等. 杂交油菜秦油2号论文集, 北京: 农业出版社, 1993. 49—65.
 [11] 孙 俊, 朱英国. 植物雄性不育的分子基础. 遗传, 1993, 15 (2): 38—41.
 [12] 孙 威, 高 洁, 李继耕等. 油菜叶绿体基因组雄性不育特异DNA片段的定位. 遗传学报, 1992, 19 (1): 55—60.
 [13] McClure B A *et al.* Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. Nature, 1990, 347: 757—760.
 [14] Kaul M. Male Sterility in Higher Plants. Springer-Verlag Press, 1988, 193—220, 356—392.
 [15] Goldberg R B. Plants, novel developmental processes. Science, 1988. 240: 1460—1467.
 [16] Mariani C. Induction of male sterility in plants by a chimaeric. Nature, 1990: 737—741.
 [17] Mariani C. A chimaeric ribonuclease—inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature, 1992, 357: 384—387.

ADVANCES OF STUDIES IN HEREDITY AND BREEDING OF RAPE

Guan Chunyun

(*Department of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128*)

Abstract In this paper, the advances in genetics and breeding for quality characteristics, microspore culture and doubled haploid breeding, gene engineering, and heterosis use of heritable traits of rape are summarized.

Key words rape, heredity, breeding

· 信 息 ·

“国家杰出青年科学基金”资助证书颁发仪式 暨座谈会在京举行

1994年度“国家杰出青年科学基金”资助证书颁发仪式暨座谈会于1995年4月14日在北京隆重举行。

“国家杰出青年科学基金”是由科学家和国家自然科学基金委员会建议，经李鹏总理批准设立的，目的是为了促进青年科技人才的成长，鼓励海外学者回国工作。1994年国家财政拨款3000万元，共有49位优秀青年学者经过严格评审后入选。

证书颁发仪式暨座谈会在热烈欢快的气氛中进行。国务院有关部委的领导同志、部分老一辈科学家和部分受资助者和青年科学家代表，共120人出席了会议。全国政协副主席、国家杰出青年科学基金评审委员会主任朱光亚向获资助者颁发了资助证书。国家自然科学基金委员会主任张存浩在讲话中指出：这项基金是党和政府为加快培养跨世纪优秀学术带头人所采取的一项重大措施，表达了党和国家对广大青年科技工作者的深切关怀，它必将极大地鼓舞海内外优秀青年学者为祖国科技事业献身的热忱，带动各部门、地方、单位对科技和人才的重视，在我国四化建设中产生深远的影响。老一辈科学家侯祥麟等在发言中着重指出：在座的青年科学家务必谦虚谨慎，戒骄戒躁，在学术上不断做出新成绩，在学风和科学道德上给全国青年学者做出良好榜样，向杰出科学家的方向努力，同时也希望全社会都来帮助和爱护这些优秀的中青年科技人才，创造良好的环境，让他们专心致志地做学问。荣获该项基金的北京大学赵新生博士等发言表示，虚心向老科学家求教，注意向周围科技人员学习，一定要以新的优异成绩报答人民给予的恩惠。

(宣调处 供稿)