

转草酸氧化酶基因的甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 的苗期人工春化条件探索

孙燕飞,康振生*,张 岗,韩青梅
(西北农林科技大学植物保护学院,陕西杨凌 712100)

摘 要: 对 4 种转草酸氧化酶基因甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 苗期人工春化条件进行研究的结果表明,春性和冬性半冬性转基因油菜移栽后,4~ 6 叶期经适当低温处理后均可正常开花结实;转基因苗不移栽直接在试管中经适当低温处理也可以通过春化阶段;春性转基因油菜的春化处理时间长短与开花时间早晚有关,春化处理时间最长的,开花也最早,与开花株率关系不大;冬性半冬性转基因油菜的开花株率与春化处理时间长短呈正相关;4~ 6 叶期转基因半冬性油菜通过春化阶段需时 35~ 40 d 以上,转基因冬性油菜通过春化阶段需时 50 d,且适当延长春化时间能促进花期提前。
关键词: 甘蓝型油菜; 转基因; 试管苗; 人工春化
中图分类号: S565. 4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-1389(2005)03-0067-03

Study on Artificial Vernalization Condition of Rapeseed (*Brassica napus* L.) with Oxalate Oxidase Gene

SUN Yan-fei, KANG Zhen-sheng*, ZHANG Gang and HAN Qing-mei
(College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Artificial vernalization technique of four oriental cultivars of transgenic rapeseeds (*Brassica napus* L.) in seedling stage was studied. The results showed that spring and winter rapeseed (*Brassica napus* L.), in their four or six-leaf stage, can flower by proper low temperature treatment days, as well as aseptic seedlings. The flowering rate of the spring rapeseed was less influenced by the treatment days, while that of the winter and semi-winter rapeseed was influenced by the treatment days; Semi-winter rapeseeds (*Brassica napus* L.) at four or six-leaf stage needed 35~ 40 days treatments to pass vernalization, and the effect was improved by prolonging treatment days, while winter rapeseeds needed 50 d.

Key words *Brassica napus* L.; Gene transformation; Aseptic seedlings; Artificial vernalization

陕西地区甘蓝型油菜的主栽品种多为半冬性和冬性品种,其抽薹、成花需要经过春化过程和适当的光周期诱导。半冬性和冬性油菜一般在冬季自然低温条件下通过春化,一年只能种植一季,受时令的限制,获得的转基因油菜一般等到冬季才移栽使其完成春化阶段,这不仅严重影响分子育种进程,而且会因夏季组培操作易污染带来损失。

孙超才等^[1,2]分别对萌芽种子、子叶期幼苗和三叶期幼苗进行人工春化条件探索,关于转基因油菜人工春化至今未见报道。本实验室在春季获得一批转草酸氧化酶基因的冬性及半冬性油菜,转基因试管生根苗已长至 3~ 4 叶期,移栽成活后均已长至 4~ 6 叶期,此时如何有效的进行人工春化处理是值得研究的问题。

* 收稿日期: 2005-01-19 修回日期: 2005-03-10
基金项目: 陕西省农业分子生物学重点实验室基金资助项目和陕西省自然科学基金项目 (2004C101)。
作者简介: 孙燕飞 (1976-),女,新疆哈密人,在读硕士,主要从事植物病理学和植物分子育种的研究。电话: 13572434067
* 通讯作者

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为冬性甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.)“P137”,半冬性甘蓝型油菜“03709”、“03603”和春性甘蓝型油菜“04Y335”(“P137”,“04Y335”由陕西省大荔杂交油菜研究中心提供;“03709”,“03603”由原陕西省农科院经作所提供)分别对这4种材料进行根癌土壤杆菌介导的草酸氧化酶基因转化,获得75株转基因苗,后经扩繁为本试验材料。未转入草酸氧化酶基因的油菜苗为对照。

1.2 试验方法

春化室设在西北农林科技大学小麦中心,在密闭条件较好的房间里安装2台窗式压缩机,供昼夜轮流降温使用;室内配备若干上、下四层带照明设备的木制培养架,光源采用日光灯,光照强度为2000 lx,温度为2~4℃,光照时间20 h/d

试验一的材料为移栽于花盆中4~6叶期的转基因苗,春化处理时段分别设20 d,30 d,35 d,40 d,50 d,60 d,以未转基因的组培苗为对照。春化结束后,置于昼夜25℃/20℃和16 h/8 h光暗的温室中,待植株现蕾和开第一朵花时记录日期,统计开花株率。

试验二的材料为转基因试管生根苗,在三角瓶中直接人工春化(对照为未转基因的组培苗),春化处理时间见表1。春化结束后,移栽于盆中,置于昼夜25℃/20℃和16 h/8 h光暗的温室中,统计开花株率。

2 结果与分析

2.1 不同春化时间对转基因油菜春化效果的影响

春性油菜的春化处理时间长短与开花时间早晚有关,春化处理时间最长的,开花也最早,与开花株率关系不大。图1图2表明:春性油菜“04Y335”随着春化处理时间延长,开花提前,但其开花株率变化不大。冬性半冬性转基因油菜的春化处理时间长短与开花时间的早晚及开花株率都有关。在保证油菜完成春化的前提下,春化处理时间越长,冬性半冬性油菜的开花时间就越早,当春化处理时间远远超过其完成春化所需天数时,这种开花早晚差距逐渐缩小。冬性半冬性油菜的春化处理时间长短与开花株率成正相关。

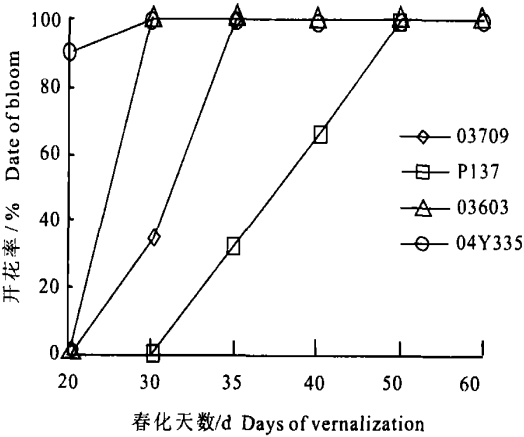


图1 油菜开花与春化时间的关系
Fig. 1 The relationship between flower and vernalization of oilseeds

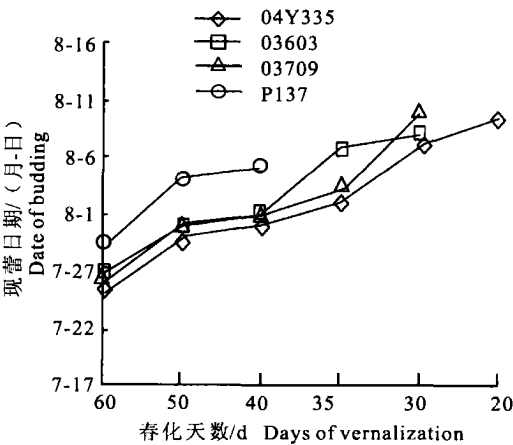


图2 油菜春化天数与现蕾早晚的关系
Fig. 2 The relationship between budding and treatment days of vernalization

同时可以看出,在2~4℃条件下4种甘蓝型4~6叶期油菜经适当低温处理可以正常开花结实。冬性油菜“P137”和半冬性油菜“03603”、“03709”四种油菜材料的开花时间均随春化处理时间的延长而提前,而且通过相同天数春化处理后,春性材料“04Y335”现蕾开花早于半冬性材料“03603”、“03709”的,半冬性材料“03603”、“03709”现蕾开花早于冬性品种“P137”。冬性材料“P137”春化处理40 d后开花率大于60%,50 d后开花率达100%;半冬性品种“03603”春化30 d后开花率为100%,而另外一个半冬性品种“03709”春化35 d开花率达100%。

2.2 转基因油菜试管苗春化结果

由表 1 可见,转基因油菜苗在试管中经适当低温处理也可以通过春化阶段,后正常开花结实。冬性材料“P137”试管苗在 2~ 4℃条件下春化 50 d 后正常开花结实,半冬性材料“03603”、“03709”春化 30~ 35 d 后亦正常开花结实,而且四种油菜材料随春化天数的增加,现蕾日期均有所提前。本试验表明转基因试管苗,经适当低温处理可以正

常开花结实,而且其体积小,占地面积小,比转基因盆栽苗便于操作。但试管苗在长时间的春化处理过程中易造成转基因苗污染,而利用盆栽苗进行春化不存在此类问题,但此法操作不便。试管苗完成春化后,现蕾和开花的时间比组培苗移栽花盆后再春化的要晚,但春化天数愈长,这种差别愈小。2 种方法均有效可根据试验条件灵活选择。

表 1 油菜试管苗开花与春化时间的关系

Table 1 The relationship between flower and vernalization for aseptic seedlings						
材料 Material (Four-leaf stage)	处理天数 Treatment days	总株数 Total plants	开花株数 Flower plants	开花 % Rate of bloom	现蕾日期 /(月 /日±天) Date of budding	开花日期 /(月 /日±天) Date of bloom
冬性油菜 P137 Winter	50	12	12	100	8/06± 2	8/15± 1
	30	7	0	0		
	20	10	0	0		
半冬性油菜 Semi-Winter	50	12	12	100	8/05± 3	8/15± 1
	30	7	2	28	8/10± 1	8/17± 1
	20	9	0	0		
半冬性油菜 03603 Semi-Winter	50	10	10	100	8/04± 2	8/11± 3
	35	9	9	100	8/07± 1	8/14± 2
	20	6	0	0		
春性油菜 04Y335 Spring	40	11	11	100	7/25± 3	8/04± 1
	30	9	9	100	7/30± 1	8/06± 0
	20	5	3	60	9/9± 1	9/16± 0

3 讨论

3.1 油菜的春化材料的选择

低温对植物开花诱导一般可在种子萌发或在植物生长的任何时期进行,有时甚至可在母体正在发育的幼胚时期进行,而有的植物只有在绿体植株生长到一定大小,才能感受低温^[3]。

依据作物接受低温的时期不同,划分为 2 种春化类型:一类是种子春化型,即在种子萌动时就接受低温春化,如大白菜、萝卜等;而另一类是绿体春化型,如甘蓝、洋葱等,植株需生长到一定大小才能感应低温而完成春化作用^[4,5]。油菜人工春化处理以种子春化为主^[5], 2~ 3 叶期春化^[1,2]。孙超才等有报道,本试验结果表明,4~ 6 叶期冬性油菜经适当低温处理均可以正常开花结实,结合前人^[2,5]的研究,说明油菜在种子、子叶期,3~ 6 叶期均可通过春化。种子阶段春化不需要光照,而苗期春化需要光照设备。另外试验中还发现,在春化处理同时给予油菜长日照可以加快油菜的生育进程。

3.2 油菜人工春化处理时间的确定

油菜的开花率及现蕾早晚与春化天数有关,

而春化天数的确立与诸多因素有关,如选择的春化材料所处的生育阶段、材料春冬性质等。即使同为半冬性油菜但基因型不同的材料所需春化的时间也有所差异:半冬性油菜“03709”和“03603”分别需 35 d 和 30 d。孙超才^[1]等利用冰箱冷藏室(2~ 4℃)对油菜萌芽种子进行春化的试验结果表明,冬性油菜需 50 d 以上完成春化。本研究中冬性油菜“P137”在 2~ 4℃和 20 h/d 光照条件下与其相差一周以上,其差异是由于春化时期不同产生的还是由于冬性品种基因型差异引起,有待进一步的研究。

3.3 转入的草酸氧化酶基因对油菜苗期春化的影响

本实验的结果表明,草酸氧化酶基因的转入与否和春化通过率并无直接关系,但在本试验中发现个别春化材料既抽薹开花亦结荚,但荚空无籽,(已转入草酸氧化酶基因的油菜苗和未转化成功的均有)。推测可能是由于外源基因随机插入导致败育,或是组培过程中发生突变所致。本试验以转基因油菜为研究对象,其遗传背景可能存在一些差异,其内在机理尚需进行深入研究。

(下转第 72 页)

异系数 30.42% (表 3)。此性状是单株产量中变异最大的一个数量性状,相关分析表明,它与单株产量为极显著正相关 ($r=0.8064$)。单荚粒数是一个稳定的产量性状,单荚粒数量多 8.0 个,最少为 4.0 个,极差 4.0,平均 6.1 个,变异系数为 13.61%,是在单株产量中变异系数最小的,相关分析与单株产量正相关,但不显著 ($r=0.0801$)。百粒重也是一个比较稳定的产量性状,百粒重最大 14.9 g,最小 7.9 g,极差 7.0,平均 10.2 g,变异系数为 16.18%,相关分析与单株产量相关不显著 ($r=0.0936$)。从以上分析结果可以看出,构成小豆单株产量的主要因素是单株荚数,其次是百数重和单荚粒数。

3 讨 论

通过对黑龙江省 239 份小豆种质资源农艺性状鉴定与评价,明确了该省保存小豆种质资源主

要以籽粒红色、中粒类型为主栽品种,但根据目前生产的需求,应加强大粒类型品种的创新。在熟期选择上要根据各地区的生态特点和栽培水平,以中熟品种为主,适当搭配早熟和晚熟类型品种。在小豆种质创新和利用上,要想获得高产新种质,必须选择结荚性强的品种,才能收到良好的效果。

参考文献:

[1] 金文林.我国北方小豆地方品种资源在南京的表现及选择潜力[J].作物品种资源,1989(3): 10~12.
[2] 程须珍,王素华.中国绿豆品种资源研究[J].作物品种资源,1998(4): 9~11.
[3] 胡家蓬.中国小豆种质资源的收集与评价[J].作物品种资源,1999(1): 17~19.
[4] 林汝法,紫岩,廖琴,等.中国小杂粮[M].北京:中国农业科学技术出版社,2002. 210~228.

(上接第 69 页)

参考文献:

[1] 孙超才,方光华,赵华,王伟荣.甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 的春化作用及其应用[J].上海农业学报,1996,12(2): 5~9.
[2] 孙超才.人工春化对甘蓝型冬性、半冬性和春性油菜开花效应的探讨[J].上海市农科院作物学报,1997,11(3): 53~56.
[3] 胡巍,侯喜林,史公军.植物春化特性及春化作用机理[J].植物学通报,2004,21(1): 26~36.
[4] 徐磊,林碧英,林义章.春化作用与甘蓝类蔬菜的生育障碍(综述)[J].亚热带植物科学,2002,31(4): 73~76.
[5] 李曙轩.蔬菜栽培生理[M].上海:上海科技出版社,1979. 119~142.