

现代分子生物技术在大白菜上的应用

张 凯¹, 徐艳辉¹, 崔明珠², 潘 丹¹

(1. 辽宁省农业科学院园艺研究所; 2. 沈阳农业大学图书馆, 辽宁 沈阳 110161)

中图分类号: Q946, S634.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2003)03-0011-03

植物分子生物学技术是一项由多学科理论、技术与工程原理综合发展起来的新科技。近年来, 分子生物学理论和技术的创新往往在蔬菜作物上进行实验, 并取得突破, 显示出巨大的应用前景。

我国作为大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis* (Lour) Olsson) 的原产地, 有着十分丰富的品种资源。现代分子生物学技术在大白菜上的研究将对大白菜生理生化、遗传图谱构建、遗传多样性、物种亲缘关系、人工构建不育系、分子标记辅助选择、品种(系)指纹图谱构建及杂种纯度鉴定等研究领域的应用, 将使我们从分子水平上认识大白菜, 并为今后的育种研究奠定基础。

1 分子生物学技术在大白菜上的应用

1.1 遗传图谱的构建

遗传图谱是遗传研究的重要内容, 又是种质资源、育种及基因克隆等许多应用研究的理论依据和基础。近缘植物的同源性为作物分子标记遗传图谱创造了极大便利。RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 技术应用于遗传作图, 不需要预先克隆标记或进行序列分析, 使遗传作图变得容易、快捷。张鲁刚等以芜菁和结球白菜杂交的 F₂ 群体为试材, 用 84 个 10bp 核苷酸随机引物, 构建了白菜的 RAPD 遗传图谱。该图谱覆盖基因组的 1632.4 cM (centiMorgan, 厘摩), 标记间的平均间隔为 16.5 cM (厘摩), 该图谱的构建为开展中国大白菜分子育种及 QTL (Quantitative Traits Location, 数量性状位点) 分析奠定了基础^[1]。

1.2 耐热性分子标记

研究和不断改进大白菜耐热性的鉴定评价方法已成为重要的应用基础研究课题。现有的研究表明, 大白菜耐热性遗传力很高的数量性状, 可能由少数基因控制。已有研究发现: 磷酸变位酶 (PGM-2) 同工酶中有与耐热性有关的位点^[2]。RAPD 和 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms 扩增片段长度多态性) 同是通过聚合酶链式反应 (PCR) 对模板 DNA 进行随机或选择扩增, 根据扩增的某一 DNA 片断的有无, 比较和鉴别不同基因组 DNA 差异。结合一系列 RAPD 引物和 AFLP 引物组合的使用, 可以使检测

区域覆盖大部分基因组。现在这些技术已用于鉴别大白菜品种多态性, 并已在很多种作物的基因连锁标记的鉴别中使用。郑晓鹰等采用单粒传的方法从大白菜耐热品种 177 和热敏感品种 276 杂交后代获得遗传性稳定的重组近交系群体, 以此为材料用同工酶以及 RAPD 和 AFLP 分子标记技术鉴定了与大白菜耐热性数量性状相关的遗传标记, 经单因子方差分析和多元线性回归分析, 结果有 9 个与耐热性 QTL 紧密连锁的分子标记, 这些标记对耐热性遗传的贡献率为 46.7%。9 个标记中有 5 个分布在同一连锁群上, 其他 4 个标记与任何一个标记无连锁关系, 即表明上述 9 个标记分布在大白菜的 5 个连锁群上^[3]。

1.3 大白菜包叶特异基因的研究

大白菜营养生长经历幼苗期、莲座期、包心期和结球期 4 个生育时期, 每个时期分别以幼叶、莲座叶、包叶和球叶为主要形态标志。叶球由轮生的叶片相互抱合而成, 是一种典型的食用变态器官。已经知道, 许多因素影响大白菜叶球的发生和发育进程。生长素在叶片内的不平衡分布、较低的温度和较大的昼夜温差、弱光和短日照, 以及充足的碳素营养都可以促进叶球的发生和发育。可以看出, 叶球的发生是一个复杂的生物学过程, 是环境因子诱导下的形态学反应。在此过程中, 基因的表达和调控是植物接受外界信号和展开发育活动的关键环节。长期以来, 我们对叶球发育过程中基因的调控作用知之甚少, 这在很大程度上妨碍了我们对叶球形态发生过程的深入了解, 使许多生理实验的结果无法得到正确的解释和证实。要清晰地了解叶球分化和发育的生理机制, 就必须首先分离与之相关的基因, 明确其结构特征和表达方式。只有这样, 才能研究激素和环境因子引起基因表达的生化反应链, 建立环境—基因—形态三者的相互关系, 了解叶球和其它植物器官发生的复杂机理。

大白菜的莲座叶和球叶是叶的两种形式, 前者主要进行光合作用, 而后者主要进行碳水化合物和其他营养物质的积累与贮藏。包叶在形态和生理功能上介于莲座叶和球叶之间, 因此是一种中间形式。不同发育时期叶子形态的规律性变化受茎顶端分生组织的控制。

余旭红等构建了大白菜包心早期茎尖组织特异的 cDNA 文库, 分别与莲座叶和包叶 cDNA 两个探针进行差异杂交, 筛选出一个全长的 cDNA 克隆 BepLH。DNA 序列和推导氨基酸序列同源性比较表明, 该基因编码的蛋白质含有两个双链 RNA 结合结构域 (dsRNA-binding domains), 与人和小鼠 dsRNA 结合蛋白基因 TRBP 具有较高的同源区域。PCR 表达分析的结果表明, BepLH 基因主要在包心期的包叶组织中



第一作者简介: 张凯, 硕士, 1971 年生。1993 年毕业于沈阳农业大学园艺系, 同年到辽宁省农科院园艺所工作, 一直从事十字花科类蔬菜的育种研究工作。

收稿日期: 2002-12-25

表达。在包心期用 IAA 涂抹植株显著增加了包叶中 BcpLH 基因的转录产物。据此认为, BcpLH 基因与包叶的发生和叶球的形成有关, 它的表达受生长素的诱导调节^[4]。

1.4 遗传多样性和物种亲缘关系

遗传多样性的研究有利于种质资源的鉴定和保存、蔬菜起源与进化的深入研究以及杂交亲本的选择。漆小泉等于 1995 年进行了大白菜和紫菜薹自交系染色体组 DNA 的 RAPD 研究, 探讨了该技术应用了蔬菜遗传多样性研究的可行性^[5]。陈云鹏等对芸薹属蔬菜基因组进行了 RAPD 初步分析, 并就 RAPD-PCR 反应条件进行了探讨, 结果表明, 各个亚种或变种的品种之间存在丰富的遗传多样性^[6]。又用 37 个随机引物将芸薹类(2n=20)蔬菜作物的 33 个品种分成 8 个类群, 印证了形态分类的正确性, 并对形态分类作了进一步完善^[7]。宋顺华等采用 RAPD 技术分析了 21 个大白菜主栽品种, 用 13 个引物共扩增出 87 个可重复的 DNA 片段, 其中 39 条带具多态性。OPE01 可区分 15 个大白菜品种, 再与 POH03, OPH12 配合可将 21 个大白菜品种区分开^[8]。

1.5 品种(系)指纹图谱构建及杂种纯度鉴定

指纹图谱是鉴别品种、品系的有效工具, 可应用于种子纯度检测, 对防止伪劣种子流入市场, 保护优异种质及育成品种的知识产权和育种者的权益等具有重要意义, 同时在研究上有助于解决种质资源收集集中存在的同物异名、同名异物的问题。陈启林等利用 PAGE 凝胶电泳对 9 个大白菜品种子叶期 EST(脂酶同工酶)同工酶和 POD(过氧化物酶)同工酶进行了品种鉴定分析, 由于 EST 凝胶电泳和 POD2 种同工酶酶谱综合多态性要比单一的一种同工酶酶谱丰富, 可将 9 个品种完全鉴别出来^[9]。宋顺华等用 RAPD 标记鉴定大白菜杂种商品种子的纯度。用 50 个随机引物检测了 2 个杂交种北京 57 号和北京 106 号及其亲本, 引物 OPE-20 在北京 57 号杂交种中产生了有别于双亲的特殊标记, 引物 OPH-06 及 OPH-07 在北京 106 号杂交种中产生了有别于双亲的特殊标记, 能清楚的区分杂交种及其双亲, 显示了 RAPD 标记在大白菜杂交种商品种子纯度检测上的实际应用^[10]。陈云鹏等运用 5 个引物扩增的 10 条 RAPD 特征带, 作为一组 DNA 指纹, 能区分 7 个大白菜品种^[7]。田蕾报道了用 AFLP 标记技术鉴定大白菜种子真实性及品种纯度的作用^[11]。

1.6 抗虫基因转化

虫害是危害蔬菜作物生产的主要因素之一。由于人们对害虫与蔬菜之间相互作用的复杂关系、蔬菜自身的抗虫性能了解甚少, 因而蔬菜作物抗虫育种远远落后于改良作物其他形状的遗传育种进程, 抗虫育种显得尤为重要。豇豆胰蛋白酶抑制(CpTI)基因为天然抗虫物质, 在植物抗虫基因工程中已得到广泛的应用。杨广东等以大白菜 3 d(天)苗龄带柄子叶为外植体, 经根癌农杆菌介导, 将修饰的豇豆胰蛋白酶抑制基因(sck)导入大白菜自交系“GP-11”和杂交种中白四号, 并获得了卡那霉素抗性植株。PCR 检测和 Southern blot 杂交证实, sck 基因已整合进入大白菜基因组中。豇豆胰蛋白酶抑制剂活性检测表明, 大部分转基因植株都对牛胰蛋白酶有一定的抑制活性, 对照未转化植株抑制活性很低。室内离体叶片饲虫和田间自然抗虫性鉴定进一步证明: 转基因植株对菜青虫(*Pieris rapae* L.)具有一定的抗性^[12]。

1.7 抗病基因的转化

大白菜病毒病一直是白菜的三大病害(病毒病、霜霉病和软腐病)之一。现已证明其主要病原为芜菁花叶病毒(TuMV)。TuMV 是马铃薯 Y 病毒属的一个种。TuMV 的侵染可造成大白菜植株不能结球, 严重影响大白菜的产量和品质。由于没有特效化学药剂, 控制病毒病害主要采用抗病品种和无病毒材料以及喷施农药来灭杀传毒蚜虫。实际上效果并不明显, 且加重了对环境的污染。培育抗病品种是防治病毒病的最佳途径, 利用常规育种方法培育的杂交种对 TuMV 具有一定的抗性, 但杂交大白菜品质、口感以及风味等远远不及一些传统的地方品种。因此利用常规育种方法改良优良的地方品种面临很多困难。

基因工程技术的发展为植物病毒病的防治提供了一条新途径。通过遗传转化将病毒外壳蛋白(CP)编码基因转入受体细胞中表达。这些病毒外壳蛋白在植物细胞中积累, 能抑制侵染病毒的复制, 从而减轻症状或推迟病毒的发生时间。这是最早获得成功, 也是至今应用最广泛的一条策略, 已在 10 个属 30 余种病毒上获得成功。在十字花科芸薹属植物的抗病毒基因工程中, 已将 TuMV-CP 基因转入了甘蓝型油菜中, 转基因植株对 TuMV 有明显的抗性。朱常像等以大白菜品种“福山大包头”的子叶柄为供试材料, 对影响大白菜植株再生和基因转化频率的因素进行了研究。在此基础上, 建立了大白菜高效再生体系和有效的基因转化体系, 并将芜菁花叶病毒的 CP 基因导入大白菜中, 获得转化植株。PCR 检测和 Southern 杂交分析证明 TuMV-CP 基因已整合于大白菜的基因组中; Northern 杂交分析及 ELISA 检测表明 TuMV-CP 在转录和翻译水平上进行了有效表达。转基因植株 T1 代的遗传分析表明, 外源基因在转基因植株后代遵循 3:1 的分离规律。抗病性测定显示, 转基因植株具有明显的抗病毒侵染能力^[13]。

1.8 抗除草剂基因转化

应用化学方法—除草剂控制杂草已经成为现代农业生产的重要组成部分。除草剂的广泛使用, 使得抗除草剂转基因研究成为一个热点。刘公社等利用大白菜小孢子胚状体获得抗除草剂转基因植株。用大白菜小孢子培养获得的子叶期胚状体, 经粉碎的玻璃碴摩擦后, 与农杆菌共培养, 在加筛选剂 Basta 的培养基上, 再生出数株绿苗, 自交留种后, 对其后代进行的 Basta 抗性鉴定显示, 抗性植株的基因组中各有一个 bar 基因插入点, 对转化株的小孢子进行再培养, 后代小孢子植株对 Basta 抗性的分离比显示此转基因为杂合体^[14]。

1.9 雄性不育基因的转化

由于大白菜为两性花异花授粉蔬菜作物。花器较小, 杂交授粉人工去雄工作量大; 加之具有明显的杂种优势, 雄性不育系的利用是配制大白菜杂交种经济、可靠的制种手段。常规选育雄性不育系工作目前多在直筒形生态类型中开展, 并取得了成功。

利用基因工程技术培育雄性不育系就是将与花粉发育有关的基因启动子与雄性不育基因或水解酶构成嵌合基因, 转入植物, 产生的蛋白酶将阻止花粉的产生, 杀死所有的花粉, 从而获得雄性不育株。这样从理论上, 任何植物均可以采用此法人工构建雄性不育系。

余沛涛等用共培养法,以根癌农杆菌质粒为载体,携带雄性不育基因和抗卡那霉素基因作报告基因,另以该农杆菌携带的抗利福平基因作为农杆菌的筛选培养。以大白菜幼苗的茎尖作为受体,转化后的幼苗用卡那霉素 50 mg/L(毫克/升)进行筛选。筛选得到的转化苗经 PCR 检测,证明雄性不育基因已转入大白菜^[15]。通过基因转化的方法得到雄性不育植株并进而形成品系不失为一条既经济又快捷的途径。这项技术的应用极有可能导致育种方法的彻底革命。

2 存在的问题和发展前景

分子生物学的发展,已经产生了一整套分子生物学技术,这些技术已经成了研究许多基本生物学问题的重要手段。通过对植物细胞 DNA 或 RNA 的提取,基因的分离,核苷酸序列的测定,我们能够了解基因及其所编码的蛋白质的结构,进而认识其功能。

综上所述,现代分子生物学技术在大白菜上的应用,较多是在 RAPD 来实现的。RAPD 技术又是以 PCR 反应为基础的,反应体系的细微变化就可能会影响到扩增结果的重复性。RAPD 技术通用性差,不同蔬菜的 RAPD 反应条件不尽相同。因此在实际应用过程中还很难大规模的直接应用,但随着分子生物技术的日益完善,相信该技术将变成程式化而变得非常易于实施,分子生物学技术在生命科学各个方面的渗透,为人们进一步认识生命活动的本质提供了帮助。

参考文献

- [1] 张鲁刚,王鸣,陈抗等.中国白菜 RAPD 分子遗传图谱的构建[J].植物学报,2000,42(5):485~489.
- [2] 郑晓鹰等.磷酸变位酶遗传表现与结球白菜耐热性的关系[J].

园艺学报,1998,25(3):252~257.

- [3] 郑晓鹰,王新建,宋顺华等.大白菜耐热性分子标记的研究[J].中国农业科学,2002,35(3):309~313.
- [4] 余旭红,彭洁松,冯献忠等.大白菜包叶特异基因的克隆及其结构特征和表达方式[J].中国科学·C 辑,2000,30(5):475~482.
- [5] 漆小泉,朱德蔚,沈锦等.大白菜和紫菜薹自交染色体组 DNA 的 RAPD 分析[J].园艺学报,1995,22(3):256~262.
- [6] 陈云鹏,曹家树,缪颖等.芸薹属(*Brassica campestris*, 2n=20)蔬菜遗传多样性的 RAPD 初步分析[J].上海农学院学报,1999,17(2):85~89.
- [7] 陈云鹏,曹家树,缪颖等.芸薹属蔬菜基因 DNA 遗传多样性的 RAPD 标记[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(3):131~136.
- [8] 宋顺华,郑晓鹰.利用 RAPD 技术鉴定大白菜主栽品种及品种间遗传多样性分析[J].华北农学报,2000,15(3):125~128.
- [9] 陈启林,陈毓荃,陈净.同工酶 PAGE 凝胶电泳在大白菜品种鉴定中的应用[J].西北农业学报,1998,7(2):94~97.
- [10] 宋顺华,郑晓鹰.利用 RAPD 标记鉴定大白菜杂交种纯度的研究[J].华北农学报,2000,15(4):35~39.
- [11] 田蕾,曹鸣元,王辉等.AFLP 标记技术在大白菜种子真实性及品种纯度鉴定中的作用[J].中国蔬菜,2001,(4).
- [12] 杨广东,朱贞,李燕娥等.大白菜转修饰豇豆胰蛋白酶抑制剂基因获得抗虫植株[J].园艺学报,2002,29(3):224~228.
- [13] 朱常香,宋云枝,张松等.抗芜菁花叶病毒转基因大白菜的培育[J].植物病理学报,2001,31(3).
- [14] 刘公社, C. Rohlfia, 等.利用大白菜小孢子胚状体获得抗除草剂转基因植株[J].华北农学报,1998,13(4):93~98.
- [15] 余沛涛,王伟,何玉科,等[J].上海农业学报,2000,16(1):17~19.

土壤栽培就是指在土壤上栽培作物的方法,它是相对于无土栽培而言的。虽然近年日本无土栽培面积增加较快,但是在设施中仅占到栽培面积的 2%,98% 仍然是土壤栽培。

土壤栽培有其优点,如对 pH 等有较强的缓冲性,有很好的保肥保水能力,各种有益菌的活动有利于植物生长等。但土壤栽培也有缺点,由于连作、大量施肥一方面对环境造成了污染,另一方面土壤病害等连作障碍逐年加重,同时引起土壤次生盐渍化。为了发挥土壤的优点,克服其缺点,日本近年采用了一些新的土壤栽培方法,主要在设施蔬菜和花卉上应用。

1 隔离床栽培 把作物根系与大地完全隔离的栽培方法。一般用塑料板做成栽培床,用有机肥和土壤充。土层厚度 20 cm~30 cm(厘米)。

2 限制根系栽培 用能通过水,不能通过根系的遮根布(是用塑料纤维织成的缝隙只有 20 μm 的布,也称防根布。)铺在土壤下,限制根系生长的栽培方法。土层厚度 30 cm(厘米)。这种栽培方法通过控制根系生长和灌水,能提高番茄果实的含糖量,因此,在番茄高糖度栽培中应用较为广泛。

3 少量土壤基质培 一般用木板做成宽 25 cm(厘米),高 10 cm(厘米)的栽培床,底部铺 3 cm(厘米)厚的稻壳,上填 7 cm(厘米)厚的土,平均一株果菜用 6 L(升)土。成为以土做为基质的营养液基质培。

以上三种栽培方法与传统的土壤栽培相比,由于用土较少,便于对土壤消毒和更换土壤,对土壤病害、线虫有很好的防效。

4 营养液土壤栽培 营养液土壤栽培技术即滴灌施肥或灌水同时施肥技术,日本称为“养液土耕”。它与普通的土壤栽培整地方法相同,但底肥只施有机肥,不施化肥。根据作物不同生育阶段对养分、水分的需求,供给必要的养分水分。这种栽培方法所需的设备与无土栽培相同,由水源、加压水泵、施肥灌、滴灌设备、水分张力计、电磁阀、计算机等构成。通过计算机控制,实现自动灌水施肥。在作物生长中,通过测定土壤、植株的养分含量和水分张力计随时调整施肥灌水量,每天灌溉 1~10 次,滴灌时只灌到作物主要根系分布层,可使肥料利用率提高到 70% 以上,避免了肥料浪费和流失,减轻了环境污染。同时,灌水施肥的劳动强度和时间只有原来的 1/10。这种栽培方法在蔬菜、花卉栽培中正在被广泛应用。

(宁夏大学农学院园林系,750105)

日本新法土壤栽培

高艳明,李建设